

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047903**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.26

(51) Int. Cl. *A61K 47/60* (2017.01)
C07K 14/55 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290833

(22) Дата подачи заявки
2020.09.09

(54) **КОНЪЮГАТЫ ИЛ-2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) **62/898,478; 62/900,488; 62/930,987;
62/953,075; 63/042,393**

(56) **WO-A1-2019028419
WO-A1-2019028425
WO-A1-2020163532**

(32) **2019.09.10; 2019.09.14; 2019.11.05;
2019.12.23; 2020.06.22**

(33) **US**

(43) **2022.08.08**

(86) **PCT/US2020/049954**

(87) **WO 2021/050554 2021.03.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИНТОРКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Птацин Джерод, Каффаро
Каролина Е., Милла Маркос (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении раскрыты композиции, наборы и способы, предусматривающие конъюгаты интерлейкина (IL) (например, конъюгаты ИЛ-2), применимые для лечения одного или нескольких признаков. Также в данном документе описаны фармацевтические композиции и наборы, содержащие один или несколько конъюгатов интерлейкина (например, конъюгатов ИЛ-2).

B1

047903

047903

B1

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной заявке на патент США № 62/898478, поданной 10 сентября 2019 г., предварительной заявке на патент США № 62/900488, поданной 14 сентября 2019 г., предварительной заявке на патент США № 62/930987, поданной 5 ноября 2019 г., предварительной заявке на патент США № 62/953075, поданной 23 декабря 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 63/042393, поданной 22 июня 2020 г., содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

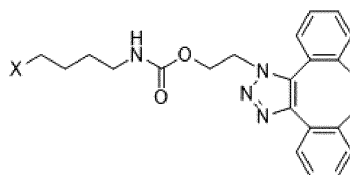
Перечень последовательностей

Настоящая заявка подана вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием "01183-0072-00PCT_ST25.txt", созданного 7 сентября 2020 г., который имеет размер 335872 байта. Представленная в электронном формате информация относительно перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Вводная часть и сущность изобретения

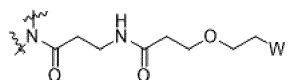
Отдельные популяции Т-клеток модулируют иммунную систему для поддержания иммунного гомеостаза и толерантности. Например, регуляторные Т-клетки (Treg) предупреждают ненадлежащие ответы иммунной системы путем предупреждения патологической аутореактивности. В некоторых случаях модуляция различных популяций Т-клеток обеспечивает вариант лечения заболевания или признака.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (I):

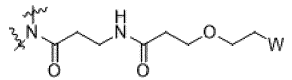


формула (I);

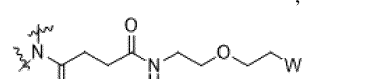
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



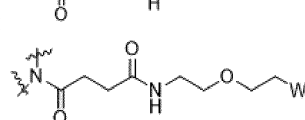
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой

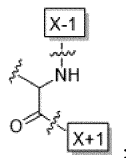


Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



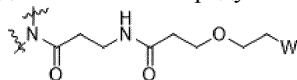
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

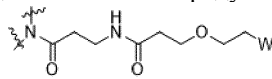


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Z представляет собой CH₂, и Y представ-

ляет собой

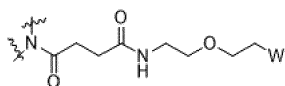


В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Y представляет собой



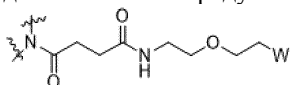
CH₂, и Z представляет собой

В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Z представляет собой CH₂,



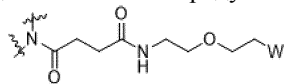
и Y представляет собой , или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Z представляет собой CH₂,



и Y представляет собой , и W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа.

В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Y представляет собой

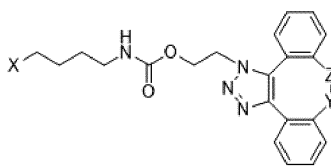


CH₂, и Z представляет собой

В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 20, 30, 40 или 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 5 кДа. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления Z и Y также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 35 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 45 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122.

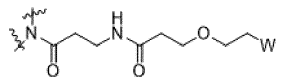
собой S124. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (I):

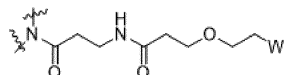


формула (I);

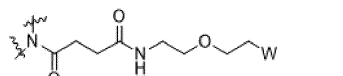
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



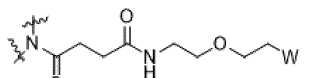
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой

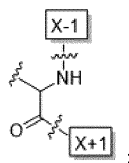


Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа;

X имеет структуру

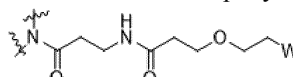


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

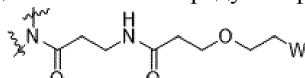
В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты

IL-2, где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



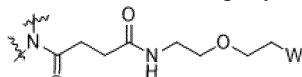
В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Y представляет собой

CH₂, и Z представляет собой



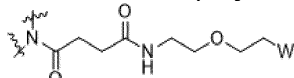
В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Z представляет собой CH₂,

и Y представляет собой



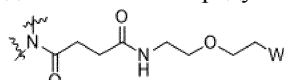
В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Z представляет собой CH₂,

и Y представляет собой



и W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где Y представляет собой CH₂, и Z представляет

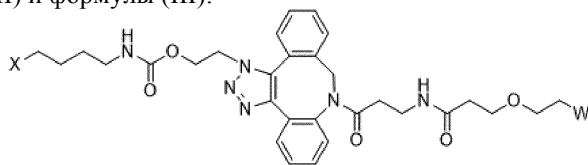
собой



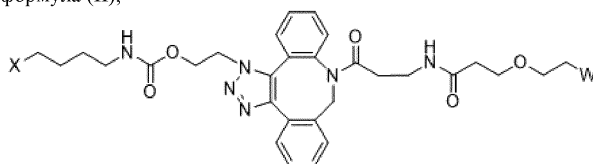
В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 20, 30, 40 или 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 5 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молеку-

лярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 35 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 45 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):



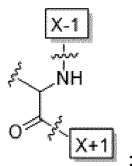
формула (II);



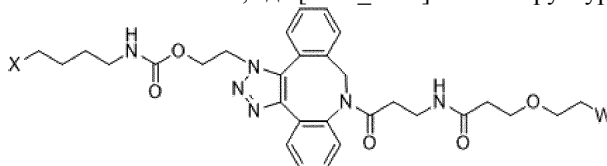
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру



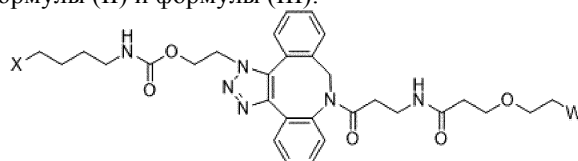
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат II-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (II) и/или (III) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где [AzK_PEG] представляет собой смесь формулы (II) и формулы (III). В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II):



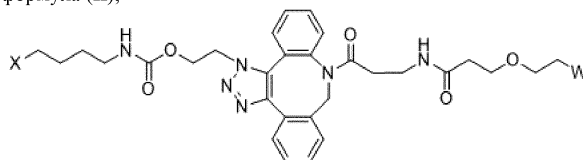
формула (II).

Здесь и по всему данному документу структура формулы (II) охватывает ее фармацевтически приемлемые соли, сольваты или гидраты. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где конъюгат II-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 5 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 35 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 45 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где конъюгат II-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 199-213. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 5 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 35 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 45 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты II-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где конъюгат II-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35 или 200. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 и 30 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюга-

под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):

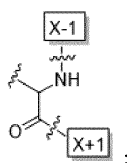


формула (II);



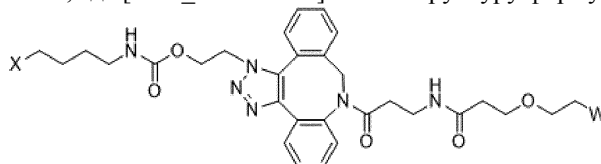
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



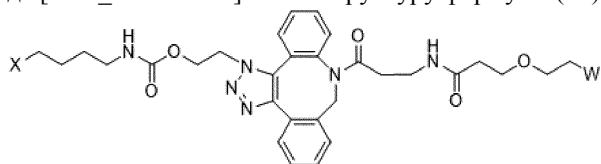
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (II):



формула (II).

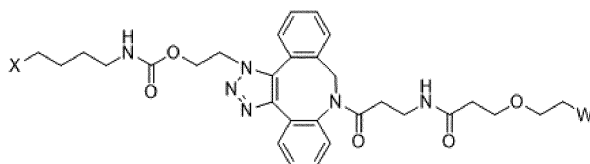
В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (III):



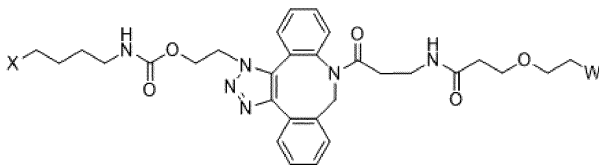
формула (III).

В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

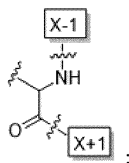


формула (II);



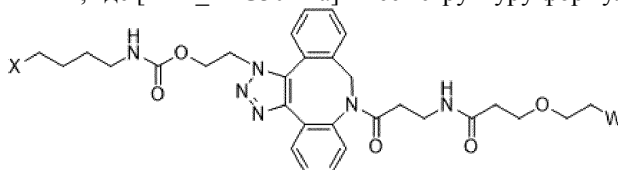
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



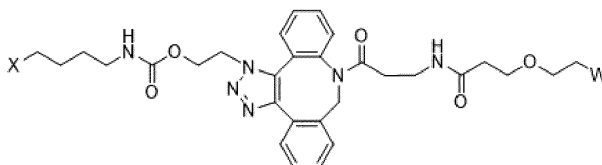
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (II):



формула (II).

В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (III):

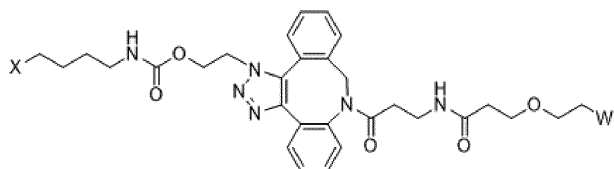


формула (III).

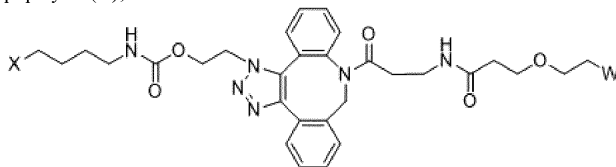
В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] представлен смесь структур формулы (II) и формулы (III):

047903



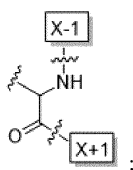
формула (II);



формула (III);

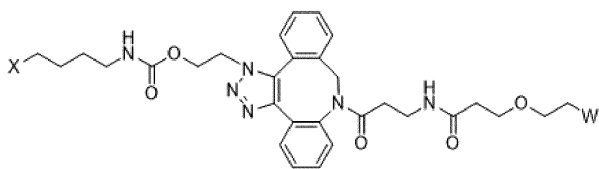
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

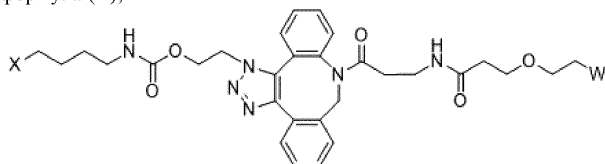


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой линейную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой разветвленную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу метокси-PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является линейной. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является разветвленной.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

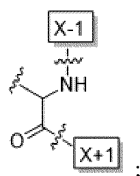


формула (II);



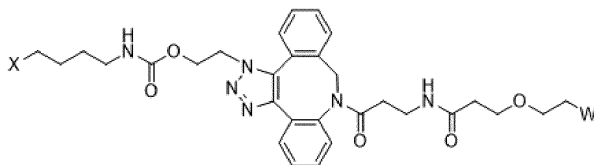
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру

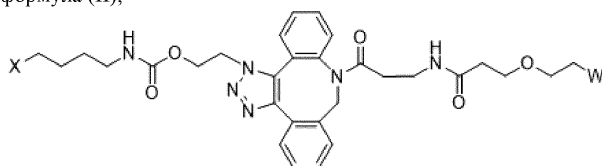


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

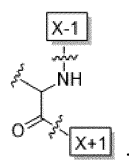


формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

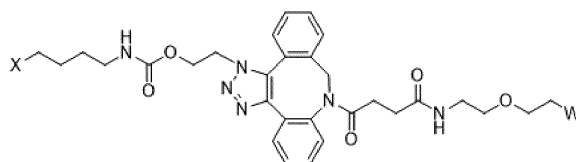


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

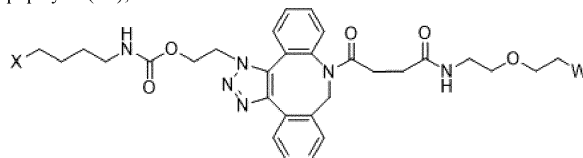
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V):



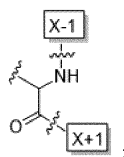
формула (IV);



формула (V);

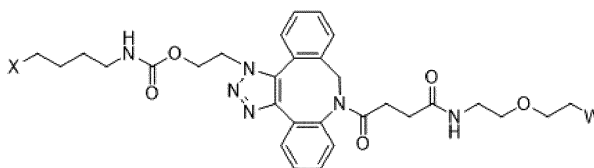
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру



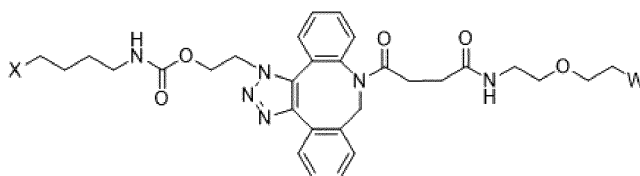
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (IV) и/или (V) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG] представляет собой смесь формулы (IV) и формулы (V). В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (IV):



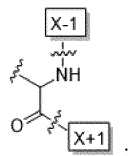
формула (IV).

Здесь и по всему данному документу структура формулы (IV) охватывает ее фармацевтически приемлемые соли, сольваты или гидраты. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 109-123. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 и 30 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 5 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155 или 110. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 и 30 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 5 кДа. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 35 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 45 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В данном документе дополнительно предусмотрены конъюгаты IL-2, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа.



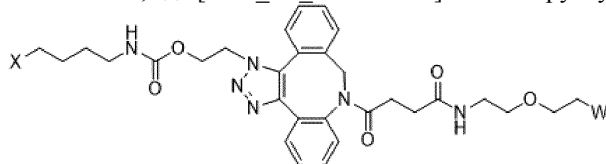
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



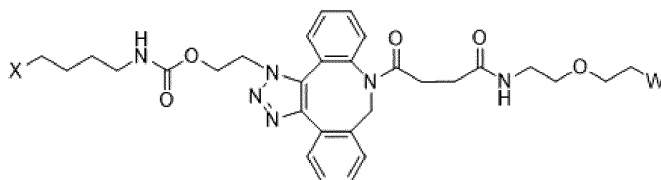
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (IV):



формула (IV).

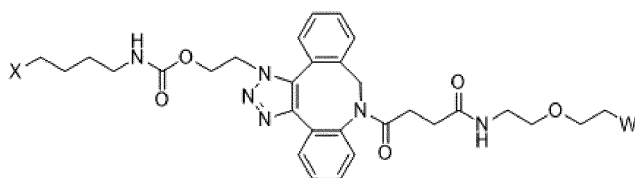
В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (V):



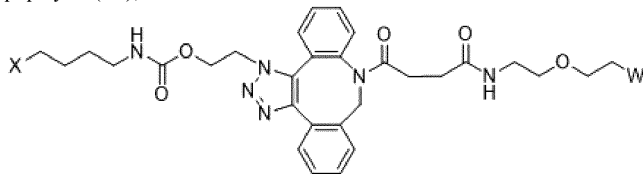
формула (V).

В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

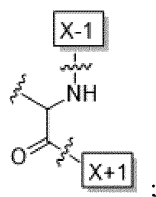


формула (IV);



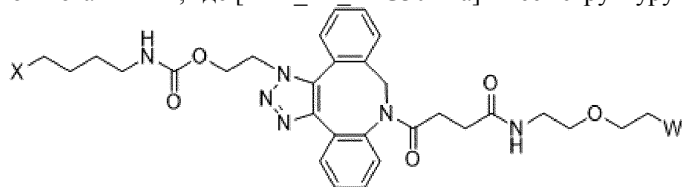
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



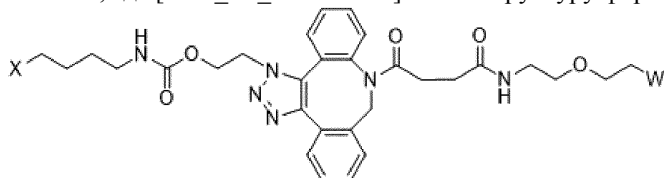
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (IV):



формула (IV).

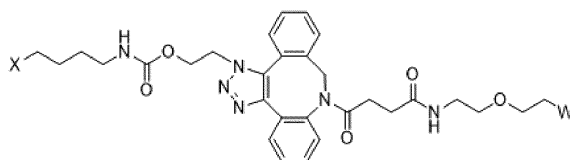
В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (V):



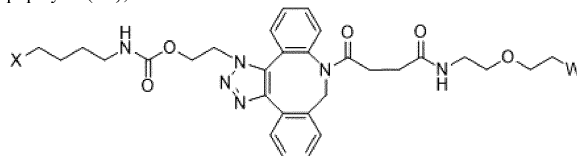
формула (V).

В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [Azk_L1_PEG] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):



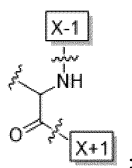
формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

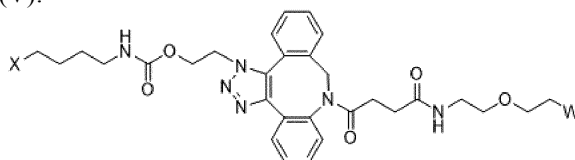
X имеет структуру



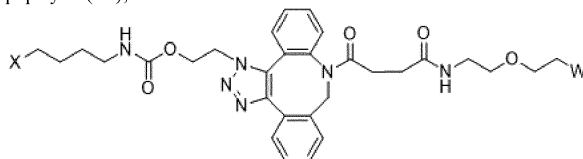
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой линейную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой разветвленную группу PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где W представляет собой группу метокси-PEG. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является линейной. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где группа метокси-PEG является разветвленной.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183 и 124-138, где [AzK_L1_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

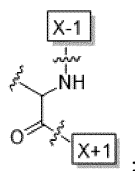


формула (IV);



формула (V);

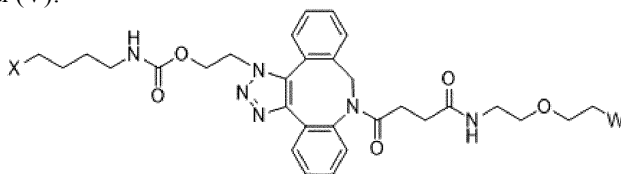
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



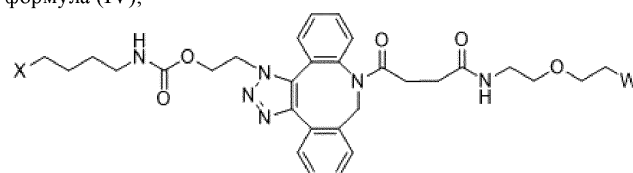
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

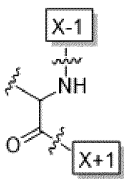


формула (IV);



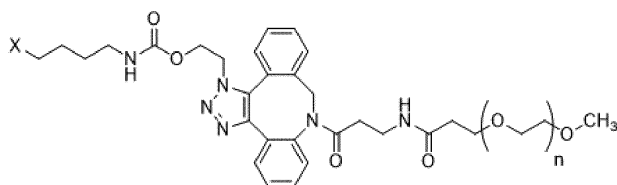
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

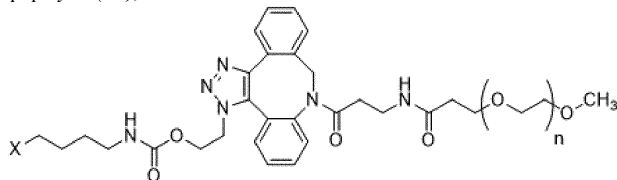


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

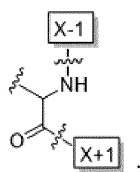


формула (VI);



(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

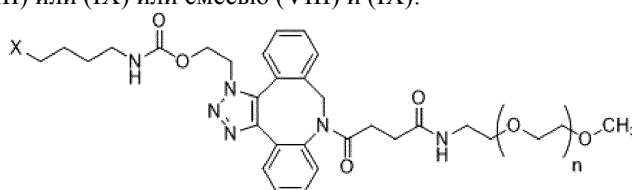


$X-1$ указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

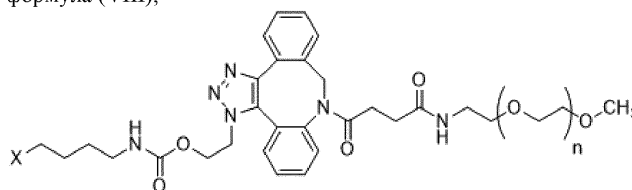
$X+1$ указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (VI) и/или (VII) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8 в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R. В данном

документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S124. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

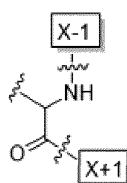


формула (VIII);



формула (IX);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

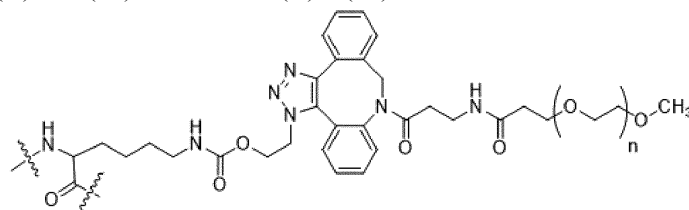


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

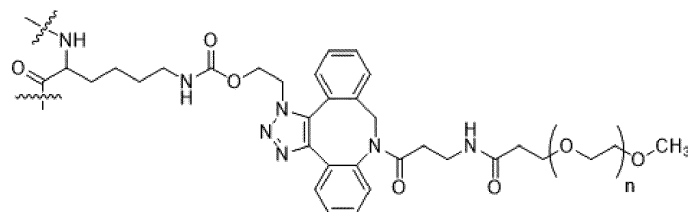
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (VIII) и/или (IX) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, 191, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описа-

ны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S124. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (X) или (XI) или смесью (X) и (XI):



формула (X);

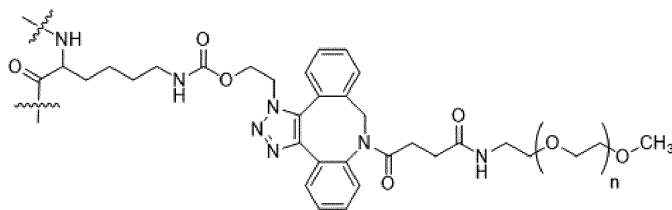


формула (XI);

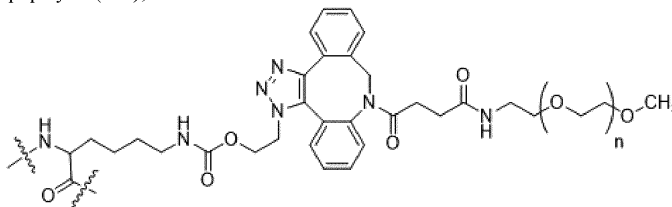
где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3, которые не заменены. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (X) и/или (XI) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47,

A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S124. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XII) или (XIII) или смесью (XII) и (XIII):



формула (XII);

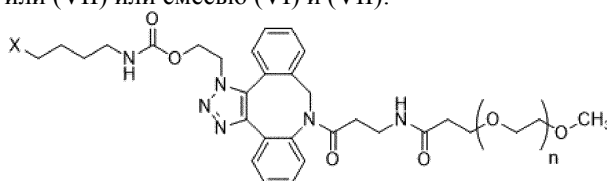


формула (XIII);

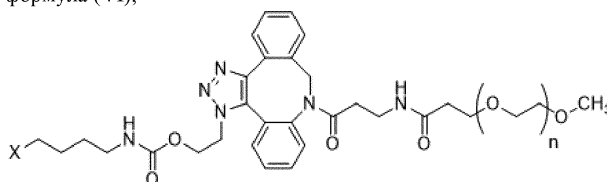
где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3, которые не заменены. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (XII) и/или (XIII) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122.

сти конъюгата IL-2 представляет собой S124. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 675 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1140. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 450. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 568. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 682. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 795. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 909. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1022. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1136. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1363.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

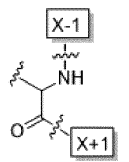


формула (VI);



(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

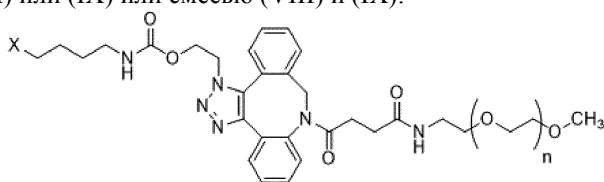


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

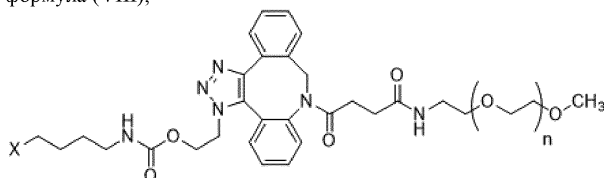
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104,

под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

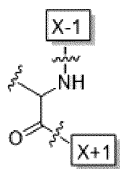


формула (VIII);



формула (IX);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

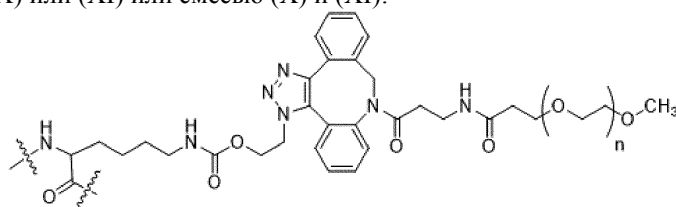


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

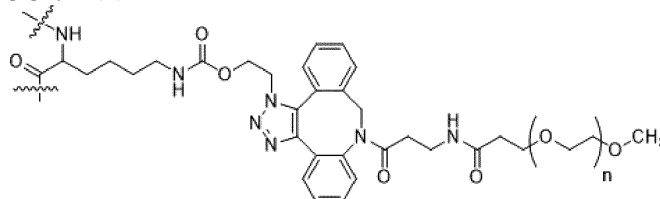
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте

N88R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 675 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1140. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 450. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 568. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 682. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 795. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 909. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1022. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1136. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где n составляет приблизительно 1363.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (X) или (XI) или смесью (X) и (XI):

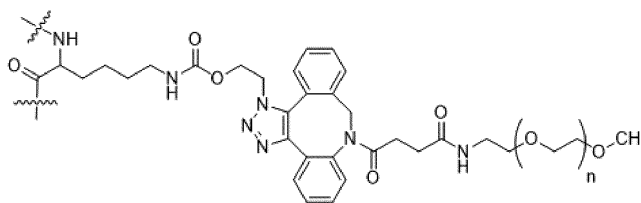


формула (X);

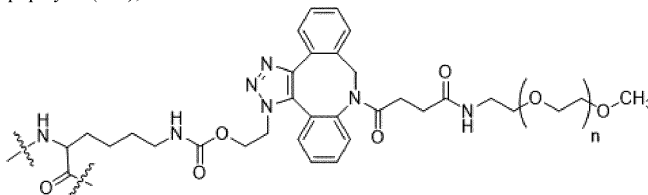


формула (XI);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В данном документе дополнительно опи-



формула (XII);

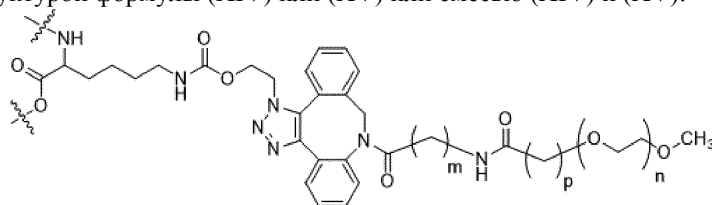


формула (XIII);

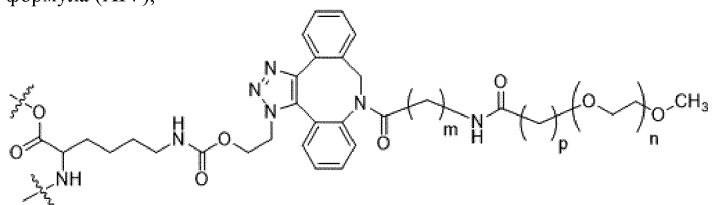
где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131. В данном

документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1370. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 600 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 675 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 680 до приблизительно 1140. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет от приблизительно 450. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 568. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 682. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 795. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 909. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 1022. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 1136. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 1250. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где n составляет приблизительно 1363.

В данном документе описаны конъюгаты II-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате II-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV):



формула (XIV),



формула (XV),

где m представляет собой целое число от 0 до 20;

p представляет собой целое число от 0 до 20;

n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и

волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, которые не заменены. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (XIV) и/или (XV) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты II-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате II-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где m, p, n и значение волнистой линии описаны выше. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты II-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате II-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где m, p, n и значение волнистой линии описаны выше.

В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XIV) и формуле (XV) предусматривает рацемическую смесь, предусматривает смесь, обогащенную (R), предусматривает смесь, обогащенную (S), предусматривает по сути только (R), предусматривает по сути только (S), предусматривает только (R) или предусматривает только (S). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XIV) и формуле (XV) предусматривает рацемическую смесь. В не-

ления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 3, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 4, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 5, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 6, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 7, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 8, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 9, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 10, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 11, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 12, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором в соединениях формул (XIV) и (XV) m составляет 2, p составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136 и 1137.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором n в соединениях формул (XIV) и (XV) представляет собой целое число, выбранное из 2, 5, 10, 11, 22, 23, 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137, 1249, 1250, 1251, 1362, 1363, 1364, 1476, 1477, 1478, 1589, 1590, 1591, 1703, 1704, 1705, 1817, 1818, 1819, 1930, 1931, 1932, 2044, 2045, 2046, 2158, 2159, 2160, 2271, 2272, 2273, 2839, 2840, 2841, 2953, 2954, 2955, 3408, 3409, 3410, 3976, 3977, 3978, 4544, 4545, и 4546.

В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, если конъюгат II-2 содержит SEQ ID NO: 3, положение структуры формулы (XIV) и (XV) или смеси формул (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XIV) или

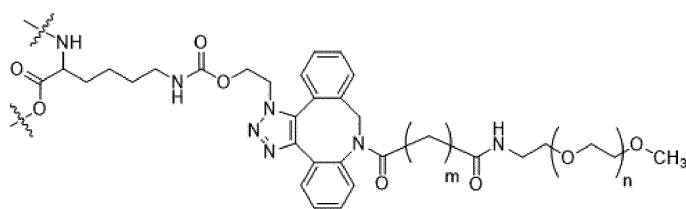
где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XIV) или (XV) или смеси (XIV) и (XV) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором соотношение количества структуры формулы (XIV) и количества структуры формулы (XV), содержащихся в общем количестве конъюгата IL-2, составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором соотношение количества структуры формулы (XIV) и количества структуры формулы (XV), содержащихся в общем количестве конъюгата IL-2, составляет более чем 1:1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором соотношение количества структуры формулы (XIV) и количества структуры формулы (XV), содержащихся в общем количестве конъюгата IL-2, составляет менее чем 1:1.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 3, который заменен, выбран из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130, и где n представляет собой целое число от 100 до приблизительно 1150, или от приблизительно 100 до приблизительно 1100, или от приблизительно 100 до приблизительно 1000, или от приблизительно 100 до приблизительно 900, или от приблизительно 100 до приблизительно 750, или от приблизительно 100 до приблизительно 700, или от приблизительно 100 до приблизительно 600, или от приблизительно 100 до приблизительно 575, или от приблизительно 100 до приблизительно 500, или от приблизительно 100 до приблизительно 450, или от приблизительно 100 до приблизительно до приблизительно 350, или от приблизительно 100 до приблизительно 275, или от приблизительно 100 до приблизительно 230, или от приблизительно 150 до приблизительно 475, или от приблизительно 150 до приблизительно 340, или от приблизительно 113 до приблизительно 340, или от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 340 до приблизительно 795, или от приблизительно 341 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909, или от приблизительно 227 до приблизительно 1500, или от приблизительно 225 до приблизительно 2280, или от приблизительно 460 до приблизительно 2160, или от приблизительно 460 до приблизительно 2050, или от приблизительно 341 до приблизительно 1820, или от приблизительно 341 до приблизительно 1710, или от приблизительно 341 до приблизительно 1250, или от приблизительно 225 до приблизительно 1250, или от приблизительно 341 до приблизительно 1250, или от приблизительно 341 до приблизительно 1136, или от приблизительно 341 до приблизительно 1023, или от приблизительно 341 до приблизительно 910, или от приблизительно 341 до приблизительно 796, или от приблизительно 341 до приблизительно 682, или от приблизительно 341 до приблизительно 568, или от приблизительно 114 до приблизительно 1000, или от приблизительно 114 до приблизительно 950, или от приблизительно 114 до приблизительно 910, или от приблизительно 114 до приблизительно 800, или от приблизительно 114 до приблизительно 690, или от приблизительно 114 до приблизительно 575. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором n в соединениях формул (XIV) и (XV) представляет собой целое число, выбранное из 2, 5, 10, 11, 22, 23, 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137, 1249, 1250, 1251, 1362, 1363, 1364, 1476, 1477, 1478, 1589, 1590, 1591, 1703, 1704, 1705, 1817, 1818, 1819, 1930, 1931, 1932, 2044, 2045, 2046, 2158, 2159, 2160, 2271, 2272, 2273, 2839, 2840, 2841, 2953, 2954, 2955, 3408, 3409, 3410, 3976, 3977, 3978, 4544, 4545, и 4546.

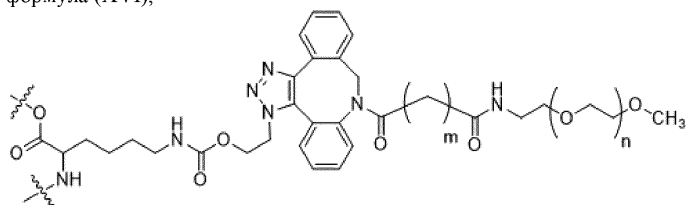
В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 3, который заменен, выбран из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131, и где n представляет собой целое число от 100 до приблизительно 1150, или от приблизительно 100 до приблизительно 1100, или от приблизительно 100 до приблизительно 1000, или от приблизительно 100 до приблизительно 900, или от приблизительно 100 до приблизительно 750, или от приблизительно

но 100 до приблизительно 700, или от приблизительно 100 до приблизительно 600, или от приблизительно 100 до приблизительно 575, или от приблизительно 100 до приблизительно 500, или от приблизительно 100 до приблизительно 450, или от приблизительно 100 до приблизительно до приблизительно 350, или от приблизительно 100 до приблизительно 275, или от приблизительно 100 до приблизительно 230, или от приблизительно 150 до приблизительно 475, или от приблизительно 150 до приблизительно 340, или от приблизительно 113 до приблизительно 340, или от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 340 до приблизительно 795, или от приблизительно 341 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909, или от приблизительно 227 до приблизительно 1500, или от приблизительно 225 до приблизительно 2280, или от приблизительно 460 до приблизительно 2160, или от приблизительно 460 до приблизительно 2050, или от приблизительно 341 до приблизительно 1820, или от приблизительно 341 до приблизительно 1710, или от приблизительно 341 до приблизительно 1250, или от приблизительно 225 до приблизительно 1250, или от приблизительно 341 до приблизительно 1250, или от приблизительно 341 до приблизительно 1136, или от приблизительно 341 до приблизительно 1023, или от приблизительно 341 до приблизительно 910, или от приблизительно 341 до приблизительно 796, или от приблизительно 341 до приблизительно 682, или от приблизительно 341 до приблизительно 568, или от приблизительно 114 до приблизительно 1000, или от приблизительно 114 до приблизительно 950, или от приблизительно 114 до приблизительно 910, или от приблизительно 114 до приблизительно 800, или от приблизительно 114 до приблизительно 690, или от приблизительно 114 до приблизительно 575. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором n в соединениях формул (XIV) и (XV) представляет собой целое число, выбранное из 2, 5, 10, 11, 22, 23, 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137, 1249, 1250, 1251, 1362, 1363, 1364, 1476, 1477, 1478, 1589, 1590, 1591, 1703, 1704, 1705, 1817, 1818, 1819, 1930, 1931, 1932, 2044, 2045, 2046, 2158, 2159, 2160, 2271, 2272, 2273, 2839, 2840, 2841, 2953, 2954, 2955, 3408, 3409, 3410, 3976, 3977, 3978, 4544, 4545, и 4546.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где n представляет собой такое целое число, что молекулярная масса фрагмента PEG находится в диапазоне от приблизительно 1000 дальтон до приблизительно 200000 дальтон, или от приблизительно 2000 дальтон до приблизительно 150000 дальтон, или от приблизительно 3000 дальтон до приблизительно 125000 дальтон, или от приблизительно 4000 дальтон до приблизительно 100000 дальтон, или от приблизительно 5000 дальтон до приблизительно 100000 дальтон, или от приблизительно 6000 дальтон до приблизительно 90000 дальтон, или от приблизительно 7000 дальтон до приблизительно 80000 дальтон, или от приблизительно 8000 дальтон до приблизительно 70000 дальтон, или от приблизительно 5000 дальтон до приблизительно 70000 дальтон, или от приблизительно 5000 дальтон до приблизительно 65000 дальтон, или от приблизительно 5000 дальтон до приблизительно 60000 дальтон, или от приблизительно 5000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 6000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 7000 дальтон до приблизительно 45000 дальтон, или от приблизительно 7000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 8000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 8500 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 8500 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 9000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 9000 дальтон до приблизительно 45000 дальтон, или от приблизительно 9000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 9000 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 9000 дальтон до приблизительно 30000 дальтон, или от приблизительно 9500 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 9500 дальтон до приблизительно 30000 дальтон, или от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 45000 дальтон, или от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 15000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 15000 дальтон до приблизительно 45000 дальтон, или от приблизительно 15000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 15000 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 15000 дальтон до приблизительно 30000 дальтон, или от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 50000 дальтон, или от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 45000 дальтон, или от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 40000 дальтон, или от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 35000 дальтон, или от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 30000 дальтон. В данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XIV) или (XV) или смесью (XIV) и (XV), где n представляет собой такое целое число, что молекулярная масса фрагмента PEG составляет приблизительно 5000 дальтон, приблизительно 7500 дальтон, прибли-



формула (XVI),



формула (XVII),

где m представляет собой целое число от 0 до 20;

n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и

волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, которые не заменены. Здесь и по всему данному документу варианты осуществления формулы (XVI) и/или (XVII) также охватывают их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где m , p , n и значение волнистой линии описаны выше. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где m , p , n и значение волнистой линии описаны выше.

В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает рацемическую смесь, предусматривает смесь, обогащенную (R), предусматривает смесь, обогащенную (S), предусматривает по сути только (R), предусматривает по сути только (S), предусматривает только (R) или предусматривает только (S). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает рацемическую смесь. В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает смесь, обогащенную (R). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает смесь, обогащенную (S). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает по сути только (R). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает по сути только (S). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает только (R). В некоторых вариантах осуществления стереохимия хирального центра в формуле (XVI) и формуле (XVII) предусматривает только (S).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет от 1 до 20, или от 1 до 18, или от 1 до 16, или от 1 до 14, или от 1 до 12, или от 1 до 10, или от 1 до 9, или от 1 до 8, или от 1 до 7, или от 1 до 6, или от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 2. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 3. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 4. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 5. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 6. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 7. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 8. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 9. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором m в соединениях формул (XVI) и (XVII) составляет 10. В некоторых вариантах осуществления в

бранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 3, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136 и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 4, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 5, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 6, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 7, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 8, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 9, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136 и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 10, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 11, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136 и 1137. В некоторых вариантах осуществления конъюгата II-2, описанного в данном документе, в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 12, и n представляет собой целое число, выбранное из 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, и 1137. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136 и 1137.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором n в соединениях формул (XVI) и (XVII) представляет собой целое число, выбранное из 2, 5, 10, 11, 22, 23, 113, 114, 227, 228, 340, 341, 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137, 1249, 1250, 1251, 1362, 1363, 1364, 1476, 1477, 1478, 1589, 1590, 1591, 1703, 1704, 1705, 1817, 1818, 1819, 1930, 1931, 1932, 2044, 2045, 2046, 2158, 2159, 2160, 2271, 2272, 2273, 2839, 2840, 2841, 2953, 2954, 2955, 3408, 3409, 3410, 3976, 3977, 3978, 4544, 4545, и 4546.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором положение структуры формулы (XVI) и (XVII) или смеси формул (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2, предусматривающей SEQ ID NO: 3, выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат II-2, в котором положение структуры формулы (XVI) и (XVII) или смеси формул (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 под SEQ ID NO: 3 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой K8. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой H15. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты II-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата II-2 представляет собой L18. В данном документе дополнительно описаны конъю-

1362, 1363, 1364, 1476, 1477, 1478, 1589, 1590, 1591, 1703, 1704, 1705, 1817, 1818, 1819, 1930, 1931, 1932, 2044, 2045, 2046, 2158, 2159, 2160, 2271, 2272, 2273, 2839, 2840, 2841, 2953, 2954, 2955, 3408, 3409, 3410, 3976, 3977, 3978, 4544, 4545, и 4546.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 3, который заменен, выбран из H15, и где n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором n в соединениях формул (XVI) и (XVII) представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137 и 1249.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 3, который заменен, выбран из H15, и где n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором n в соединениях формул (XVI) и (XVII) представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909 и 910.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 3, который заменен, представляет собой H15, и где n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором n в соединениях формул (XVI) и (XVII) представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909 и 910. В некоторых вариантах осуществления n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000. В некоторых вариантах осуществления n составляет от приблизительно 550 до приблизительно 800. В некоторых вариантах осуществления n составляет приблизительно 681.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором положение структуры формулы (XVI) и (XVII) или смеси формул (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2, предусматривающей SEQ ID NO: 4, выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26. В данном документе дополнительно описаны конъюгаты IL-2, где положение структуры формулы (XVI) или (XVII) или смеси (XVI) и (XVII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88. В данном документе дополнительно описаны

но 7500 дальтон, приблизительно 10000 дальтон, приблизительно 15000 дальтон, приблизительно 20000 дальтон, приблизительно 25000 дальтон, приблизительно 30000 дальтон, приблизительно 35000 дальтон, приблизительно 40000 дальтон, приблизительно 45000 дальтон или приблизительно 50000 дальтон.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 4 представляет собой H16, m представляет собой целое число от 1 до 6, и n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909, 910, 1021, 1022, 1023, 1135, 1136, 1137 и 1249.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 4, который заменен, представляет собой H16, и где m представляет собой целое число от 1 до 6, и n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909 и 910.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XVI) или (XVII) или смесью (XVI) и (XVII), где аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 4, который заменен, представляет собой E61, и где m представляет собой целое число от 1 до 6, и n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 800, или от приблизительно 454 до приблизительно 796, или от приблизительно 454 до приблизительно 682, или от приблизительно 568 до приблизительно 909. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, в котором в соединениях формул (XVI) и (XVII) m составляет 2, и n представляет собой целое число, выбранное из 454, 455, 568, 569, 680, 681, 682, 794, 795, 796, 908, 909 и 910. В некоторых вариантах осуществления n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000. В некоторых вариантах осуществления n составляет от приблизительно 550 до приблизительно 800. В некоторых вариантах осуществления n составляет приблизительно 681.

В данном документе описаны способы лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), атопического дерматита, болезни Крона, очаговой алопеции, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, дерматомиозита, диабета 1 типа, ювенильного/детского диабета 1 типа, ювенильного идиопатического артрита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, тяжелой миастении, рассеянного склероза, пемфигуса/пемфигоида, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного билиарного цирроза, неалкогольного стеатогепатита (NASH), псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, CREST-синдрома, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, тиреоидита, увеита, витилиго, гранулематоза Вегенера, болезни Аддисона (надпочечниковой недостаточности), тиреоидита Хашимото, аутоиммунного гепатита, бесплодия, ANCA-ассоциированного васкулита, псориазического артрита, целиакии, язвенного колита, склерозирующего лишая и болезни Бехчета. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), атопического дерматита, болезни Крона, диабета 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, тяжелой миастении, первичного билиарного цирроза, неалкогольного стеатогепатита (NASH), гломерулонефрита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, системной красной волчанки, склеродермии, CREST-синдрома, псориаза, целиакии, язвенного колита, пемфигуса, псориазического артрита и бесплодия. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD). В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой атопический дерматит. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Крона. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой диабет 1 типа. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание

представляет собой ревматоидный артрит. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой тяжелую миастению. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой первичный билиарный холангит или первичный билиарный цирроз. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH). В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой гломерулонефрит. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой склеродермию. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой CREST-синдром. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой бесплодие. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель или один раз в 8 недель. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, или один раз в 4 недели. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в две недели. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в три недели. В данном документе дополнительно описаны способы, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в четыре недели. В данном документе дополнительно описаны способы, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие повышенной концентрации ревматоидного фактора в крови субъекта до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно описаны способы, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 14 МЕ/мл или выше или приблизительно 15 МЕ/мл или выше. В данном документе дополнительно описаны способы, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 14 МЕ/мл или выше. В данном документе дополнительно описаны способы, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 15 МЕ/мл или выше.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие: (а) определение концентрации ревматоидного фактора в крови субъекта и (б) введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 14 МЕ/мл. В данном документе дополнительно описаны способы, где терапевтически эффективное количество конъюгата IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту, если концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 15 МЕ/мл.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 14 МЕ/мл.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 15 МЕ/мл. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно описаны способы, где у субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста с применением метода определения скорости по Вестергрэну до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно описаны способы, где у субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста с применением метода определения скорости по Винтробу до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где субъект представляет собой женщину в возрасте до 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрэна, составляющей более чем приблизительно 20 мм/ч. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где субъект представляет собой женщину в возрасте более 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрэна, составляющей более чем приблизительно 30 мм/ч. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где субъект представляет собой мужчину в возрасте до 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрэна, составляющей более чем приблизи-

тельно 15 мм/ч. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где субъект представляет собой мужчину в возрасте более 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более 20 мм/ч. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где субъект представляет собой ребенка и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более чем приблизительно 10 мм/ч.

В данном документе описаны способы лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие: (а) определение скорости оседания эритроцитов (ESR) у субъекта и (б) введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что ESR является аномальной. В данном документе дополнительно описаны способы, где у субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста с применением метода определения скорости по Винтробу. В данном документе дополнительно описаны способы, где у субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста с применением метода определения скорости по Вестергрону. В данном документе дополнительно описаны способы, где субъект представляет собой женщину в возрасте до 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более чем приблизительно 20 мм/ч. В данном документе дополнительно описаны способы, где субъект представляет собой женщину в возрасте более 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более чем приблизительно 30 мм/ч. В данном документе дополнительно описаны способы, где субъект представляет собой мужчину в возрасте до 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более чем приблизительно 15 мм/ч. В данном документе дополнительно описаны способы, где субъект представляет собой мужчину в возрасте более 50 лет и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более 20 мм/ч. В данном документе дополнительно описаны способы, где субъект представляет собой ребенка и характеризуется скоростью оседания эритроцитов, измеренной по методу Вестергрена, составляющей более чем приблизительно 10 мм/ч. В данном документе дополнительно предусмотрены способы, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие повышенной концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови субъекта до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2. В данном документе дополнительно описаны способы, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови, составляющей более 10 мг/л, до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2.

В данном документе описаны способы лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие: (а) определение концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови субъекта и (б) введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация С-реактивного белка (CRP) в крови субъекта является аномальной. В данном документе дополнительно описаны способы, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови, составляющей более 10 мг/л, до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие: (а) определение концентрации антител к циклическому цитрулиновому пептиду (антител к CCP) в крови субъекта и (б) введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта является аномальной. В данном документе дополнительно описаны способы, где терапевтически эффективное количество конъюгата IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту, если определено, что концентрация антител к циклическому цитрулиновому пептиду (антител к CCP) в крови субъекта составляет более чем приблизительно 20 МЕ/мл.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация антител к циклическому цитрулиновому пептиду (антител к CCP) в крови субъекта является аномальной.

В данном документе описаны способы лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе, если определено, что концентрация антител к циклическому цитрулиновому пептиду (антител к CCP) в крови субъекта составляет более чем приблизительно 20 МЕ/мл. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой псориаз. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой целиакию. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой язвенный колит. В данном документе дополнительно описаны способы, где аутоиммунное заболевание представляет собой пемфигус.

В данном документе описаны способы облегчения или устранения аутоиммунного состояния, смоделированного, представленного и/или характеризующегося гиперчувствительностью замедленного типа (DTH), у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного

количества конъюгата IL-2, описанного в данном документе.

Краткое описание графических материалов

Новые признаки настоящего изобретения конкретно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемых графических материалов.

На фиг. 1 показаны иллюстративные неприродные аминокислоты. Эта фигура адаптирована из фиг. 2 из Young et al., "Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon," J. of Biological Chemistry 285(15): 11039-11044 (2010).

На фиг. 2А-2В показаны иллюстративные неприродные аминокислоты. На фиг. 2А показаны иллюстративные производные лизина. На фиг. 2В показаны иллюстративные производные фенилаланина.

На фиг. 3А-3Д показаны иллюстративные неприродные аминокислоты. Эти неприродные аминокислоты (УАА) генетически закодированы в белках (фиг. 3А - УАА № 1-42; фиг. 3В - УАА № 43-89; фиг. 3С - УАА № 90-128; фиг. 3Д - УАА № 129-167). Фиг. 3А-3Д адаптированы из табл. 1 из Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69.

На фиг. 4А-4В показаны кривые зависимости доза-ответ иллюстративного варианта IL-2 для передачи сигнала pSTAT5 в первичной клетке человека, полученной с помощью LRS (фиг. 4А), и ответ в виде пролиферации в популяциях CTLL-2 мыши (фиг. 4В).

На фиг. 5А-5С показаны графики скрининга функциональной активности конъюгатов IL-2 в DiscoverX (Фримонт, Калифорния) с использованием анализа цитокиновых рецепторов IL-2 PathHunter из примера 3. На фиг. 5А показаны графики, полученные в результате анализов с использованием IL-2 и конъюгата IL-2 D20_30kD. На фиг. 5В показаны графики, полученные в результате анализов с использованием конъюгатов IL-2 H16_30kD и L19_30kD. На фиг. 5С показаны графики, полученные в результате анализов с использованием конъюгатов IL-2 N88_30kD и L12_30kD. X-ось: в пг/мл; Y-ось: % максимального ответа.

На фиг. 6 показаны профили концентрации в плазме крови конъюгатов IL-2 K9_30kD, L19_30kD, N88R/D109_30kD, H16_30kD, Q126_30kD и N88_30kD (все в дозах 0,9 мг/кг) после введения мышам C57/BL6 из примера 4.

На фиг. 7 показано среднее кратное изменение количества Treg (% в синглетах) после введения конъюгатов IL-2 мышам C57/BL6 из примера 4.

На фиг. 8 показана доля популяции клеток Treg (CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+) в общей популяции клеток (синглеты) для конъюгатов IL-2 у мышей C57/BL6 из примера 4.

На фиг. 9А показана доля популяции Т-клеток CD8+ (CD3+ CD4-CD8+) в общей популяции клеток (синглеты) после однократного введения дозы конъюгатов IL-2 K9_30kD, L19_30kD, Q126_30kD и H16_30kD у мышей C57/BL6 из примера 4.

На фиг. 9В показана доля популяции Т-клеток CD8+ (CD3+ CD4- CD8+) в общей популяции клеток (синглеты) после однократного введения дозы конъюгатов IL-2 E100_30kD, N88R/D109_30kD, T123_30kD, N88_30kD и V91_30kD у мышей C57/BL6 из примера 4.

На фиг. 10 показаны профили концентрации конъюгатов IL-2 в плазме крови после введения дозы яванским макакам из примера 5.

На фиг. 11 показана доля популяции клеток Treg в общей популяции клеток крови (синглеты) у яванских макаков после введения конъюгатов IL-2 из примера 5.

На фиг. 12 показана доля популяции Т-клеток CD8+ в общей популяции клеток крови (синглеты) у яванских макаков после введения конъюгатов IL-2 из примера 5.

На фиг. 13 показаны графики зависимости концентрации в плазме крови от времени для варианта H16_30kD у приматов, отличных от человека, при дозах 0,12 мг/кг и 0,67 мг/кг из примера 6, где доза 0,12 мг/кг показана как нижняя кривая, при этом доза 0,67 мг/кг показана как верхняя кривая.

На фиг. 14 показаны графики зависимости концентрации в плазме крови от времени для варианта H16_30kDa и варианта H16_50kDa у приматов, отличных от человека, в дозе 0,12 мг/кг и варианта H16_50kDa в дозе 0,2 мг/кг из примера 6, где кривая для варианта 30 кДа показана как нижняя кривая (квадраты), а кривая для варианта 50 кДа показана как верхняя кривая (треугольники).

На фиг. 15 показаны графики процента Treg у отдельных особей в зависимости от времени после введения дозы у приматов, отличных от человека, из примера 6 для варианта H16_30kDa в дозе 0,12 мг/кг и варианта H16_50kDa в дозе 0,2 мг/кг, где кривая для среды-носителя представляет собой нижнюю кривую (квадраты), кривая для варианта 30 кДа показана в виде средней кривой, а кривая для варианта 50 кДа показана в виде верхней кривой.

На фиг. 16 показана схема исследования согласно примеру 7 для оценки эффектов H16_50kD в отношении гиперчувствительности замедленного типа (DTH) у мышей C57BL/6. DTH у мышей индуцировали гемоцианином фисуриллы (KLH) (подвергание воздействию в день 7 после сенсibilизации в день 1 посредством подкожной инъекции) с введением доз H16_50kD (дни 0 и 3) при дозах в количестве 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг в соответствии с примером 7.

На фиг. 17А-17С показаны изменения измерений толщины уха и иммунотипов крови мышей

C57BL/6 из примера 7. На фиг. 17A показана площадь под кривой (AUC) для увеличенной толщины уха по сравнению с мышами, в случае которых подвергание воздействию KLH осуществляли только в день 7. На фиг. 17B показаны изменения в измерениях толщины уха у мышей C57BL/6 до подвергания воздействию KLH (в день 7), а затем впоследствии в дни 8, 9 и 10. На фиг. 17C показаны изменения во времени относительного процента Т-клеток CD4⁺ в клеточной популяции CD25⁺FoxP3⁺ в образцах цельной крови мышей. "Только KLH" означает подвергание воздействию KLH только в день 7 (без сенсibilизации в день 1) с введением дозы только среды-носителя. "Среда-носитель" указывает на сенсibilизацию (день 1) и подвергание воздействию (день 7) KLH при введении доз только среды-носителя. "0,03" указывает на сенсibilизацию и подвергание воздействию KLH при введении H16_50kD в дозе 0,03 мг/кг. "0,1" указывает на сенсibilизацию и подвергание воздействию KLH при введении H16_50kD в дозе 0,1 мг/кг. "0,3" указывает на сенсibilизацию и подвергание воздействию KLH при введении H16_50kD в дозе 0,3 мг/кг. "CsA" указывает на сенсibilизацию и подвергание воздействию KLH при введении дозы циклоспорина А. См. также табл. 10 в примере 7.

На фиг. 18A-18C показаны изменения с течением времени относительного процента клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в популяции клеток CD45⁺ (фиг. 18A), в популяции клеток TCRβ⁺ (фиг. 18B) и в популяции клеток CD4⁺ (фиг. 18C) в образцах цельной крови мышей из примера 7.

На фиг. 19 показаны абсолютные значения количества клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в день 10 в образцах цельной крови мышей из примера 7.

Подробное описание изобретения

Цитокины включают семейство белков передачи сигналов в клетке, таких как хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины, факторы некроза опухоли и другие факторы роста, участвующие в гомеостазе врожденных и адаптивных иммунных клеток. Цитокины продуцируются клетками иммунной системы, такими как макрофаги, В-лимфоциты, Т-лимфоциты и тучные клетки, эндотелиальными клетками, фибробластами и различными стромальными клетками. В некоторых случаях цитокины модулируют баланс между гуморальным и клеточным иммунными ответами.

Интерлейкины представляют собой сигнальные белки, которые модулируют развитие и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, клеток моноцитарной линии дифференцировки, нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, мегакариоцитов и гемопозитических клеток. Интерлейкины продуцируются хелперными CD4 Т- и В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и эндотелиальными клетками и другими тканевыми резидентами.

Интерлейкин 2 (IL-2) представляет собой плейотропный цитокин 1 типа, структура которого содержит пучок из четырех α-спиралей с молекулярной массой 15,5 кДа. Форма-предшественник IL-2 имеет длину 153 аминокислотных остатка, при этом первые 20 аминокислот образуют сигнальный пептид, а остатки 21-153 образуют зрелую форму. IL-2 продуцируется главным образом CD4⁺ Т-клетками после стимуляции антигеном и в меньшей степени CD8⁺ клетками, натуральными киллерными (NK) клетками и натуральными киллерными (NKT) Т-клетками, активированными дендритными клетками (DC) и тучными клетками. Передача сигнала IL-2 происходит посредством взаимодействия со специфическими комбинациями субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R), IL-2Rα (также известного как CD25), IL-2Rβ (также известного как CD122) и IL-2Rγ (также известного как CD132). Взаимодействие IL-2 с IL-2Rα образует комплекс рецептора IL-2 "с низкой аффинностью" с K_d, составляющей приблизительно 10⁻⁸ М. Взаимодействие IL-2 с IL-2Rβ и IL-2Rγ образует комплекс рецептора IL-2 "с промежуточной аффинностью" с K_d, составляющей приблизительно 10⁻⁹ М. Взаимодействие IL-2 со всеми тремя субъединицами IL-2Rα, IL-2Rβ и IL-2Rγ образует комплекс рецептора IL-2 "с высокой аффинностью" с K_d, составляющей приблизительно >10⁻¹¹ М.

В некоторых случаях передача сигнала IL-2 посредством комплекса IL-2Rαβγ "с высокой аффинностью" модулирует активацию и пролиферацию регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки или CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки (Treg) опосредуют поддержание иммунного гомеостаза путем подавления эффекторных клеток, таких как CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и NKT-клетки. В некоторых случаях Treg-клетки образуются в тимусе (tTreg-клетки) или индуцируются их образованием из Т-клеток, не подвергавшихся воздействию, на периферии (pTreg-клетки). В некоторых случаях Treg-клетки считаются медиатором периферической толерантности. И действительно, в одном исследовании перенос CD25-истощенных периферических CD4⁺ Т-клеток вызывал ряд аутоиммунных заболеваний у "голых" мышей, тогда как совместный перенос CD4⁺CD25⁺ Т-клеток подавлял развитие аутоиммунитета (Sakaguchi, et al., "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25)," J. Immunol. 155(3): 1151-1164 (1995)). Увеличение популяции Treg-клеток подавляет пролиферацию эффекторных Т-клеток и подавляет аутоиммунные и противоопухолевые ответы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрывается способ селективной активации отдельной (отдельных) популяции (популяций) лимфоцитов (например, CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных клеток и клеток памяти, NK-клеток или NKT-клеток) посредством передачи сигналов цитокин/цитокиновый рецептор. В некоторых случаях цитокин предусматривает интер-

лейкин, интерферон или фактор некроза опухоли. В некоторых случаях цитокин представляет собой конъюгат цитокина, например, конъюгат интерлейкина, конъюгат интерферона или конъюгат фактора некроза опухоли. В дополнительных случаях в данном документе описаны фармацевтические композиции и наборы, содержащие один или несколько конъюгатов цитокина, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе также описан способ селективной активации популяций CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных клеток и клеток памяти, NK-клеток и/или NKT-клеток посредством передачи сигналов IL-2/IL-2R. В некоторых случаях IL-2 является конъюгатом IL-2, который взаимодействует с комплексом IL-2Rβγ "с промежуточной аффинностью", необязательно с такой же эффективностью, что и комплекс IL-2Rαβγ, и с ослабленным взаимодействием IL-2Rα по сравнению с IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, кроме того, в данном документе описаны способы лечения рака с применением конъюгата IL-2, описанного в данном документе. В дополнительных вариантах осуществления в данном документе описаны фармацевтические композиции и наборы, которые содержат один или несколько конъюгатов IL-2, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2 содержат конъюгирующие фрагменты (например, PEG), которые способствуют увеличению или уменьшению "скорости клиренса" или периода полужизни в плазме крови у субъекта, не влияя на фармакокинетику, включая желаемые взаимодействия цитокин-рецептор и экспансию иммунных клеток.

Конъюгаты цитокина.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты цитокина. В некоторых случаях цитокин предусматривает интерлейкины, фактор некроза опухоли, интерферон, хемокин, лимфокин или фактор роста. В некоторых случаях цитокин представляет собой интерлейкин. В некоторых случаях цитокин представляет собой интерферон. В дополнительных случаях цитокин представляет собой фактор некроза опухоли. В других случаях цитокин представляет собой фактор роста.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат интерлейкина. Иллюстративные интерлейкины включают без ограничения интерлейкин 2 (IL-2).

Конъюгаты IL-2.

В данном документе описаны полипептиды, показанные в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, описанные в данном документе, представлены в качестве примера в табл. 1.

Таблица 1

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
IL-2 (Homo sapiens) (зрелая форма)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKGYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (Homo sapiens) (предшественник) № доступа в NCBI: AAB46883.1	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKH LQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	2
альдеслейкин	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKGYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	3
IL-2_C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKGYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	4
IL-2_K9X	APTSSSTKXTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR	5

	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_H16X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	6
IL-2_L19X	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	7
IL-2_D20X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	8
IL-2_M23X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ I L NGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	9
IL-2_N26X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILG INNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	10
IL-2_N88X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	11
IL-2_E100X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	12
IL-2_N119X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	13
IL-2_T123X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	14
IL-2_Q126X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	15
IL-2_S127X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	16
IL-2_T131X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	17
IL-	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR	18

2_N88R_D109X	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS R IN VIVLELKGSETTFMCEY A XETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_V91X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN X IVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	19
IL-2_K9[AzK]	APTSSSTK [AzK] TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	20
IL-2_H16[AzK]	APTSSSTKKTQLQLE [AzK] LLLDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	21
IL-2_L19[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLL [AzK] DLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	22
IL-2_D20[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLL [AzK] LQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	23
IL-2_M23[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ [AzK] ILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	24
IL-2_N26[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL [AzK] GINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS AQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	25
IL-2_N88[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS [AzK] IN VIVLELKGSETTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	26
IL-2_E100[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKG [AzK] ITTFMCEY ADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	27
IL-2_N119[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFL [AzK] RWITFSQSIISTLT	28
IL-2_T123[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRW [AzK] FSQSIISTLT	29
IL-2_Q126[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFS [AzK] SIISTLT	30
IL-2_S127[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR	31

	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK]IISTLT	
IL-2_T131[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK]ILT	32
IL-2_N88R_D109[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY A[AzK]ET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	33
IL-2_K9[AzK_PEG]	APTSSSTK[AzK_PEG]TQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	34
IL-2_H16[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG]LLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	35
IL-2_L19[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG]DLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	36
IL-2_D20[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG]LQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	37
IL-2_M23[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG]ILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	38
IL-2_N26[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK_PEG]GINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	39
IL-2_N88[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK_PEG]IN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	40
IL-2_E100[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKG[S[AzK_PEG]TTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	41
IL-2_N119[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFL[AzK_PEG]RWITFSQSIISTLT	42
IL-2_T123[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWI[AzK_PEG]FSQSIISTLT	43
IL-	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR	44

2_Q126[AzK_PEG]	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSJ[AzK_PEG]SIISTLT	
IL- 2_S127[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK_PEG]IISTLT	45
IL- 2_T131[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY ADETATI VEFLNRWITFSQSIS[AzK_PEG]LT	46
IL- 2_N88R_D109[Az K_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEY A[AzK_P EG]ETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	47
IL- 2_V91[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN[AzK_PEG]IVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	48
IL- 2_K9[AzK_PEG50 kDa]	APTSSSTK[AzK_PEG50kDa]TQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	49
IL- 2_H16[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG50kDa]LLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	50
IL- 2_L19[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG50kDa]DLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	51
IL- 2_D20[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK_PEG50kDa]LQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	52
IL- 2_M23[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG50kDa]ILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFM CEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	53
IL- 2_N26[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK_PEG50kDa]G INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	54
IL- 2_N88[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK_PEG50kDa]IN VIVLELKGSETTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	55
IL- 2_E100[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKG[S[AzK_PEG50kDa]]TTF MCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIIISTLT	56
IL-	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR	57

2_N119[AzK_PEG 50kDa]	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFL[AzK_PEG50kDa]RWITFSQSIISTLT	
IL- 2_T123[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWJ[AzK_PEG50kDa]FSQSIISTLT	58
IL- 2_Q126[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFS[AzK_PEG50kDa]SIISTLT	59
IL- 2_S127[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK_PEG50kDa]IISTLT	60
IL- 2_T131[AzK_PEG 50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK_PEG50kDa]LT	61
IL- 2_N88R_D109[Az K_PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS RIN VIVLELKGSETTFMCEYA[AzK_P EG50kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	62
IL- 2_V91[AzK_PEG5 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN[AzK_PEG50kDa]IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	63
IL- 2_K9[AzK_PEG30 kDa]	APTSSSTK[AzK_PEG30kDa]TQLQLEHLLLDLQ MILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	64
IL- 2_H16[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG30kDa]LLLDLQ MILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	65
IL- 2_L19[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG30kDa]DLQ MILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	66
IL- 2_D20[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK_PEG30kDa]LQ MILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	67
IL- 2_M23[AzK_PEG 30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG30kDa]ILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK P LEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	68
IL- 2_N26[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MIL[AzK_PEG30kDa]G INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	69
IL-	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR	70

2_N88[AzK_PEG30kDa]	MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK_PEG30kDa]IN VIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_E100[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKG[SzK_PEG30kDa]TTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	71
IL-2_N119[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFL[AzK_PEG30kDa]RWITFSQSIISTLT	72
IL-2_T123[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWII[AzK_PEG30kDa]FSQSIISTLT	73
IL-2_Q126[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFS[AzK_PEG30kDa]SIISTLT	74
IL-2_S127[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK_PEG30kDa]IISTLT	75
IL-2_T131[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK_PEG30kDa]LT	76
IL-2_N88R_D109[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISIN VIVLELKGSETTFMCEYA[AzK_PEG30kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	77
IL-2_V91[AzK_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQS KNFHLRPRDLISNIN[AzK_PEG30kDa]IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	78
IL-2_K8X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSK NFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	79
IL-2_H15X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSK NFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	80
IL-2_L18X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSK NFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	81
IL-2_D19X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQC LEEELK PLEEV LNLAQSK NFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	82

IL-2_M22X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQXILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	83
IL-2_N25X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILXGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	84
IL-2_N87X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISXINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	85
IL-2_E99X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSTTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	86
IL-2_N118X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLXRWITFSQSIISTLT	87
IL-2_T122X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWIXFSQSIISTLT	88
IL-2_Q125X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSXSIIISTLT	89
IL-2_S126X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQXIISTLT	90
IL-2_T130X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISXLT	91
IL-2_N87R_D108X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYAXETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	92
IL-2_V90X	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINXIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	93
IL-2_K8[AzK]	PTSSSTK[AzK]TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	94
IL-2_H15[AzK]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK]LLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	95

IL-2_L18[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK]DLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	96
IL-2_D19[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK]LQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	97
IL-2_M22[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK]ILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLT	98
IL-2_N25[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK]GINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	99
IL-2_N87[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK]INVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	100
IL-2_E99[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKG[S[AzK]]TFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	101
IL-2_N118[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK]RWITFSQSIISTLT	102
IL-2_T122[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRW[I[AzK]]FSQSIISTLT	103
IL-2_Q125[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK]SIISTLT	104
IL-2_S126[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK]IISTLT	105
IL-2_T130[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK]LT	106
IL-2_N87R_D108[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[R]INVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK]ETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	107
IL-2_V90[AzK]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNIN[AzK]IVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFSQSIISTLT	108

IL- 2_K8[AzK_L1_PEG]	PTSSSTK[AzK L1 PEG]TQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	109
IL- 2_H15[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG]LLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	110
IL- 2_L18[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG]DLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	111
IL- 2_D19[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK L1 PEG]LQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	112
IL- 2_M22[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK L1 PEG]ILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	113
IL- 2_N25[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK L1 PEG]GINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	114
IL- 2_N87[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG]INVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	115
IL- 2_E99[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKG[S AzK L1 PEG]TFMCE EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	116
IL- 2_N118[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK L1 PEG]RWITFSQSIISTLT	117
IL- 2_T122[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRW[I AzK L1 PEG]FSQSIISTLT	118
IL- 2_Q125[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK L1 PEG]SIISTLT	119
IL- 2_S126[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG]IISTLT	120
IL- 2_T130[AzK_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG]LT	121

IL- 2_N87R_D108[Az K_L1_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININIVVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	122
IL- 2_V90[AzK_L1_P EG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININ[AzK L1 PEG]IVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	123
IL- 2_K8[AzK_L1_PE G50kDa]	PTSSSTK[AzK L1 PEG50kDa]TQLQLEHLLLDLQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	124
IL- 2_H15[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG50kDa]LLLDLQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	125
IL- 2_L18[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG50kDa]DLQML NGINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	126
IL- 2_D19[AzK_L1_P EG50kDa]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG50kDa]LQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	127
IL- 2_M22[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK L1 PEG50kDa]ILN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	128
IL- 2_N25[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML[AzK L1 PEG50kDa] GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININIVVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	129
IL- 2_N87[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG50kDa]INIVVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	130
IL- 2_E99[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININIVVLELKGS[AzK L1 PEG50kDa]T TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	131
IL- 2_N118[AzK_L1_ PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININIVVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK L1 PEG50kDa]RWITFSQSIISTLT	132
IL- 2_T122[AzK_L1_ PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININIVVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRW[AzK L1 PEG50kDa]FSQSIISTLT	133
IL- 2_Q125[AzK_L1_ PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININIVVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK L1 PEG50kDa]SIISTLT	134

IL- 2_S126[AzK_L1_P EG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG50kDa]IISTLT	135
IL- 2_T130[AzK_L1_ PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG50kDa]LT	136
IL- 2_N87R_D108[Az K_L1_PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG50kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	137
IL- 2_V91[AzK_L1_P EG50kDa]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNIN[AzK L1 PEG50kDa]IVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	138
IL- 2_K8[AzK_L1_PE G30kDa]	PTSSSTK[AzK L1 PEG30kDa]TQLQLEHLLLDLQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	139
IL- 2_H15[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG30kDa]LLLDLQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	140
IL- 2_L18[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG30kDa]DLQML NGINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	141
IL- 2_D19[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK L1 PEG30kDa]LQMLN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	142
IL- 2_M22[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK L1 PEG30kDa]ILN GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	143
IL- 2_N25[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML[AzK L1 PEG30kDa] GINNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	144
IL- 2_N87[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG30kDa]INVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	145
IL- 2_E99[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKG[S[AzK L1 PEG30kDa]T TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	146
IL- 2_N118[AzK_L1_ PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK L1 PEG30kDa]RWITFSQSIISTLT	147

IL- 2_T122[AzK_L1_ PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWIF[AzK L1 PEG30kDa]FSQSIISTLT	148
IL- 2_Q125[AzK_L1_ PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK L1 PEG30kDa]SIISTLT	149
IL- 2_S126[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG30kDa]IISTLT	150
IL- 2_T130[AzK_L1_ PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG30kDa]LT	151
IL- 2_N87R_D108[Az K_L1_PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG30kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	152
IL- 2_V90[AzK_L1_P EG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNIN[AzK L1 PEG30kDa]IVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	153
IL- 2_K9[AzK_L1_PE G]	APTSSSTK[AzK L1 PEG]TQLQLEHLLLDLQMLNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	154
IL- 2_H16[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG]LLLDLQMLNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	155
IL- 2_L19[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG]DLQMLNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	156
IL- 2_D20[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG]LQMLNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	157
IL- 2_M23[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK L1 PEG]ILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	158
IL- 2_N26[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML[AzK L1 PEG]GIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	159
IL- 2_N88[AzK_L1_P EG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG]INVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	160

IL- 2_E100[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKG[SzK L1 PEG]TTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	161
IL- 2_N119[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFL[AzK L1 PEG]RWITFSQSIISTLT	162
IL- 2_T123[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWJ[AzK L1 PEG]FSQSIISTLT	163
IL- 2_Q126[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFS[AzK L1 PEG]SIISTLT	164
IL- 2_S127[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG]IISTLT	165
IL- 2_T131[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG]LT	166
IL- 2_N88R_D109[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	167
IL- 2_V91[AzK_L1_PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHRLRPRDLISNIN[AzK L1 PEG]IVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	168
IL- 2_K9[AzK_L1_PEG50kDa]	APTSSTK[AzK L1 PEG50kDa]TQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	169
IL- 2_H16[AzK_L1_PEG50kDa]	APTSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG50kDa]LLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	170
IL- 2_L19[AzK_L1_PEG50kDa]	APTSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG50kDa]DLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	171
IL- 2_D20[AzK_L1_PEG50kDa]-2	APTSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG50kDa]LQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	172
IL- 2_M23[AzK_L1_PEG50kDa]	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQ[AzK L1 PEG50kDa]IL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHRLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	173

IL- 2_N26[AzK_L1_P EG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK L1 PEG50kDa]GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	174
IL- 2_N88[AzK_L1_P EG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG50kDa]INVIVLELKGSE TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	175
IL- 2_E100[AzK_L1_ PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSAzK L1 PEG50kDa TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	176
IL- 2_N119[AzK_L1_ PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFL[AzK L1 PEG50kDa]RWITFSQSIISTLT	177
IL- 2_T123[AzK_L1_ PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWIAzK L1 PEG50kDa]FSQSIISTLT	178
IL- 2_Q126[AzK_L1_ PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFS[AzK L1 PEG50kDa]SIISTLT	179
IL- 2_S127[AzK_L1_P EG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG50kDa]IISTLT	180
IL- 2_T131[AzK_L1_ PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG50kDa]LT	181
IL- 2_N88R_D109[Az K_L1_PEG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG50kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	182
IL- 2_V91[AzK_L1_P EG50kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISIN[AzK L1 PEG50kDa]IVLELKGSE TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	183
IL- 2_K9[AzK_L1_PE G30kDa]	APTSSSTK[AzK L1 PEG30kDa]TQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	184
IL- 2_H16[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLE[AzK L1 PEG30kDa]LLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	185
IL- 2_L19[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK L1 PEG30kDa]DLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	186

IL- 2_D20[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK L1 PEG30kDa]LQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	187
IL- 2_M23[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK L1 PEG30kDa]IL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	188
IL- 2_N26[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK L1 PEG30kD a]GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	189
IL- 2_N88[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLIS[AzK L1 PEG30kDa]INVIVLELKGSE TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	190
IL- 2_E100[AzK_L1_ PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSAzK L1 PEG30kDa TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	191
IL- 2_N119[AzK_L1_ PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFL[AzK L1 PEG30kDa]RWITFSQSIISTLT	192
IL- 2_T123[AzK_L1_ PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWJ[AzK L1 PEG30kDa]FSQSIISTLT	193
IL- 2_Q126[AzK_L1_ PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFS[AzK L1 PEG30kDa]SIISTLT	194
IL- 2_S127[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQ[AzK L1 PEG30kDa]IISTLT	195
IL- 2_T131[AzK_L1_ PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIIS[AzK L1 PEG30kDa]LT	196
IL- 2_N88R_D109[Az K_L1_PEG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISRIVKIVLELKGSETTFMCEYA[AzK L1 PEG30kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	197
IL- 2_V91[AzK_L1_P EG30kDa]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN[AzK L1 PEG30kDa]IVLELKGSE TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	198
IL- 2_K8[AzK_PEG]	PTSSSTK[AzK PEG]TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	199

IL- 2_H15[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG]LLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	200
IL- 2_L18[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG]DLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	201
IL- 2_D19[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK_PEG]LQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	202
IL- 2_M22[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG]ILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	203
IL- 2_N25[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL[AzK_PEG]GINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	204
IL- 2_N87[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK_PEG]INVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	205
IL- 2_E99[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKG[SzK_PEG]ITTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	206
IL- 2_N118[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK_PEG]RWITFSQSIISTLT	207
IL- 2_T122[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWII[AzK_PEG]FSQSIISTLT	208
IL- 2_Q125[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK_PEG]SIISTLT	209
IL- 2_S126[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK_PEG]IISTLT	210
IL- 2_T130[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK_PEG]LT	211
IL- 2_N87R_D109[Az K_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK PE G]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	212

IL- 2_V90[AzK_PEG]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININ[AzK_PEG]IVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	213
IL- 2_K8[AzK_PEG50 kDa]	PTSSSTK[AzK_PEG50kDa]TQLQLEHLLLDLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	214
IL- 2_H15[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG50kDa]LLLDLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	215
IL- 2_L18[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG50kDa]DLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	216
IL- 2_D19[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK_PEG50kDa]LQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	217
IL- 2_M22[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG50kDa]ILNGIN NYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	218
IL- 2_N25[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML[AzK_PEG50kDa]GI NNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	219
IL- 2_N87[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK_PEG50kDa]INVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	220
IL- 2_E99[AzK_PEG5 0kDa]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKG[SzK_PEG50kDa]TTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	221
IL- 2_N118[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK_PEG50kDa]RWITFSQSIISTLT	222
IL- 2_T122[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRW[AzK_PEG50kDa]FSQSIISTLT	223
IL- 2_Q125[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK_PEG50kDa]SIISTLT	224
IL- 2_S126[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK_PEG50kDa]IISTLT	225

IL- 2_T130[AzK_PEG 50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK_PEG50kDa]LT	226
IL- 2_N87R_D108[Az K_PEG50kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK PE G50kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	227
IL- 2_V90[AzK_PEG5 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNIN[AzK_PEG50kDa]IVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	228
IL- 2_K8[AzK_PEG30 kDa]	PTSSSTK[AzK_PEG30kDa]TQLQLEHLLLDLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	229
IL- 2_H15[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLE[AzK_PEG30kDa]LLLDLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	230
IL- 2_L18[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLL[AzK_PEG30kDa]DLQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	231
IL- 2_D19[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLL[AzK_PEG30kDa]LQMLNGI NNYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	232
IL- 2_M22[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[AzK_PEG30kDa]ILNGIN NYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	233
IL- 2_N25[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML[AzK_PEG30kDa]GI NNYKNPKLTRMLTTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	234
IL- 2_N87[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLIS[AzK_PEG30kDa]INVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	235
IL- 2_E99[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKG[S[AzK_PEG30kDa]TTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	236
IL- 2_N118[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFL[AzK_PEG30kDa]RWITFSQSIISTLT	237
IL- 2_T122[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRW[I[AzK_PEG30kDa]FSQSIISTLT	238

IL- 2_Q125[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFS[AzK_PEG30kDa]SIISTLT	239
IL- 2_S126[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQ[AzK_PEG30kDa]IISTLT	240
IL- 2_T130[AzK_PEG 30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIIS[AzK_PEG30kDa]LT	241
IL- 2_N87R_D108[Az K_PEG30kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYA[AzK PE G30kDa]ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	242
IL- 2_V90[AzK_PEG3 0kDa]	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNIN[AzK_PEG30kDa]IVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	243
IL- 2_L12[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQ[AzK_PEG30kDa]QLEHLLLDLQMLNG INNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	244
IL- 2_E15[AzK_PEG3 0kDa]	APTSSSTKKTQLQ[AzK_PEG30kDa]HLLLDLQMLNG INNYKNPKLTRMLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	245
IL-2_V91K_C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNIN[KIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	246
IL-2_N88R_C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	247
Пептид СТР (30 аминокислот)	FQSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ	248
Пептид СТР (31 аминокислота)	FQDSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ	249

X=сайт, содержащий неприродную аминокислоту.

[AzK]=N6-((2-азидоэтоксикарбонил)-L-лизин (структура которого раскрыта в виде соединения 90 на фиг. 3С), имеющий регистрационный номер согласно Химической реферативной службе № 1167421-25-1.

[AzK_PEG]=N6-((2-азидоэтоксикарбонил)-L-лизин, стабильно конъюгированный с PEG с помощью DBCO-опосредованной клик-химии с образованием соединения, содержащего структуру формулы (II) или формулы (III). Например, если указано, PEG50kD обозначает линейную цепь полиэтиленгликоля со средней молекулярной массой 50 кДа, кэпированную метоксигруппой. Соотношение региоизомеров, образующихся в результате клик-реакции, составляет приблизительно 1:1 или более чем 1:1. Термин "DBCO" означает химический фрагмент, содержащий дибензоциклооктиновую группу, такой как содержащий соединение mPEG-DBCO, показанное на схеме 1 примера 1. Иллюстративная структура группы метокси-PEG показана в структуре mPEG-DBCO на схеме 1 примера 1.

[AzK_L1_PEG]=N6-((2-азидоэтоксикарбонил)-L-лизин, стабильно конъюгированный с PEG с помощью DBCO-опосредованной клик-химии с образованием соединения, содержащего структуру формулы (IV) или формулы (V). Например, если указано, PEG50kD обозначает линейную цепь полиэтиленгликоля со средней молекулярной массой 50 кДа, кэпированную метоксигруппой. Соотношение региоизомеров, образующихся в результате клик-реакции, составляет приблизительно 1:1 или более чем 1:1. Термин "DBCO" означает химический фрагмент, содержащий дибензоциклооктиновую группу, такой как содержащий соединение mPEG-DBCO, показанное на схеме 1 примера 1.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конъюгаты IL-2, модифицированные в положении аминокислоты. В некоторых случаях модификация относится к природной аминокислоте. В некоторых случаях модификация относится к неприродной аминокислоте. В некоторых случаях в данном документе описан выделенный и модифицированный полипептид IL-2, который содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях полипептид IL-2 представляет

ях усечение представляет собой N-концевую делецию. В других случаях усечение представляет собой C-концевую делецию. В дополнительных случаях усечение включает как N-концевую, так и C-концевую делеции. Например, усечение может представлять собой делецию по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 или большего количества остатков либо с N-конца, либо с C-конца, либо с обоих концов. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 или больше остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 2 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 3 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 4 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 5 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 6 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 7 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 8 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 9 остатков. В некоторых случаях полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию из по меньшей мере или приблизительно 10 остатков.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2 представляет собой функционально активный фрагмент. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130 или 1-125, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 10-133, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 20-133, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 30-133, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 10-125, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 20-125, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 1-130, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях функционально активный фрагмент содержит участок IL-2 1-125, где положения остатков относятся к положениям в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, который содержит выделенный, очищенный и модифицированный полипептид IL-2 и конъюгирующий фрагмент. В некоторых случаях конъюгат IL-2 характеризуется сниженной аффинностью в отношении субъединицы α -рецептора IL-2 (IL-2R α) по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан с аминокислотным остатком, который взаимодействует с IL-2R α (например, на границе контакта IL-2/IL-2R α). В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан с аминокислотным остатком, который располагается проксимально по отношению к границе контакта IL-2/IL-2R α (например, на расстоянии приблизительно 5 Å, приблизительно 10 Å, приблизительно 15 Å или приблизительно 20 Å от границы контакта IL-2/IL-2R α). В контексте данного документа остатки, образующие границу контакта IL-2/IL-2R α , включают остатки IL-2, которые обеспечивают гидрофобные взаимодействия, водородные связи или ионные взаимодействия с остатками из субъединицы IL-2R α .

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент соединен с аминокислотным остатком, выбранным из положения аминокислоты A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 или T133, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30 и Y31. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130,

T131, L132 и T133. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, K35, T37, M46, P47, K48, A50, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130.

В некоторых случаях конъюгат IL-2 дополнительно содержит дополнительную мутацию. В некоторых случаях дополнительная мутация находится в положении аминокислоты, выбранном из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В таких случаях аминокислота конъюгирована с дополнительным конъюгирующим фрагментом для увеличения периода полужизни в сыворотке крови, стабильности или их комбинации. В качестве альтернативы перед связыванием с дополнительным конъюгирующим фрагментом аминокислоту сначала подвергают мутации в природную аминокислоту, такую как лизин, цистеин, гистидин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, треонин или тирозин, или в неприродную аминокислоту.

В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала измеряют с помощью значения ED50. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 обеспечивает первое значение ED50 для активации комплекса передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ и второе значение ED50 для активации комплекса передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$, и при этом различие между первым значением ED50 и вторым значением ED50 является менее чем 10-кратным. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 обеспечивает первое значение ED50 для активации комплекса передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ и второе значение ED50 для активации комплекса передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$, и при этом различие между первым значением ED50 и вторым значением ED50 является менее чем 5-кратным. В некоторых случаях различие является менее чем 9-кратным, менее чем 8-кратным, менее чем 7-кратным, менее чем 6-кратным, менее чем 5-кратным, менее чем 4-кратным, менее чем 3-кратным, менее чем 2-кратным или менее чем 1-кратным.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент является связанным с N-концом или C-концом полипептида IL-2, либо непосредственно, либо опосредованно через линкерный пептид. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент (например, полимер, белок или пептид) генетически слит с IL-2 на N-конце или C-конце IL-2 и либо непосредственно, либо опосредованно через линкерный пептид. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан с N-концевым или C-концевым аминокислотным остатком. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан с реакционноспособной группой, которая связана с N-концевым или C-концевым аминокислотным остатком.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 со сниженной аффинностью связывания в отношении IL-2R α способен обеспечивать размножение популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и T-клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных T-клеток (NKT). В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент нарушает или блокирует связывание IL-2 с IL-2R α .

В некоторых случаях активация популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных T-клеток (NKT) посредством комплекса IL-2R $\beta\gamma$ модифицированным полипептидом IL-2 обеспечивает сохранение значительной эффективности активации указанной популяции клеток по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях активация модифицированным полипептидом IL-2 эквивалентна активации полипептидом IL-2 дикого типа. В других случаях активация модифицированным полипептидом IL-2 превышает активацию полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 комплексу IL-2R $\beta\gamma$ выше, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа комплексу IL-2R $\beta\gamma$. В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 по меньшей мере в 1 раз выше, чем соответствующая эффективность полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 выше в приблизительно или в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 1000 раз или больше, чем соответствующая эффективность полипептида IL-2 дикого типа. В таких случаях доза или концентрация модифицированного полипептида IL-2, используемая для достижения уровня активации популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных T-клеток (NKT), подобного уровню полипептида IL-2 дикого типа, ниже дозы или концентрации, используемой для полипептида IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления активация популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных T-клеток (NKT) посредством комплекса IL-2R $\beta\gamma$ модифицированным полипептидом IL-2 обеспечивает

сохранение значительной эффективности активации указанной популяции клеток полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 комплексу IL-2R $\beta\gamma$ ниже, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа комплексу IL-2R $\beta\gamma$. В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 ниже в приблизительно или в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз или 50 раз, чем соответствующая эффективность полипептида IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к IL-2R $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к IL-2R $\alpha\beta\gamma$. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора к IL-2R $\beta\gamma$ является улучшенной эффективностью по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала второго рецептора к IL-2R $\alpha\beta\gamma$ является ухудшенной эффективностью по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к IL-2R $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к IL-2R $\alpha\beta\gamma$, и при этом эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 1 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 2 раза или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 5 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 10 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 20 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 50 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 100 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 500 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 1000 раз или больше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора модифицированного полипептида IL-2 выше эффективности рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа к IL-2R $\beta\gamma$, а эффективность в передаче сигнала второго рецептора модифицированного полипептида IL-2 ниже эффективности рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа к IL-2R $\alpha\beta\gamma$. В некоторых случаях эффективности передачи сигнала обоих рецепторов ниже соответствующих им показателей эффективности полипептида IL-2 дикого типа. В других случаях эффективности передачи сигнала обоих рецепторов выше соответствующих им показателей эффективности полипептида IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 снижает токсическое нежелательное явление у субъекта, которому вводят конъюгат IL-2. Иллюстративные токсические нежелательные явления включают эозинофилию, повышенную проницаемость капилляров и синдром повышенной проницаемости сосудов (VLS). В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает частоту возникновения токсического нежелательного явления у субъекта на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или приблизительно 100% по сравнению со вторым субъектом, которому вводят IL-2 дикого типа или альдеслейкин. В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает тяжесть токсического нежелательного явления у субъекта на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или приблизительно 100% по сравнению со вторым субъектом, которому вводят IL-2 дикого типа или альдеслейкин.

В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает частоту возникновения эозинофилии у субъекта на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или приблизительно 100% по сравнению со вторым субъектом, которому вводят IL-2 дикого типа или альдеслейкин. В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает тяжесть эозинофилии у субъекта на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или приблизительно 100% по сравнению со вторым субъектом, которому вводят IL-2 дикого типа или альдеслейкин.

В некоторых случаях токсическое нежелательное явление представляет собой повышенную проницаемость капилляров. В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает частоту возникновения повышенной проницаемости капилляров у субъекта на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или приблизительно 100% по сравнению со вторым субъектом, которому вводят IL-2 дикого типа или альдеслейкин. В некоторых случаях конъюгат IL-2 снижает тяжесть повышенной проницаемости капилля-

с пониженной токсичностью. В некоторых случаях конъюгат IL-2 характеризуется увеличенными периодом полужизни в плазме крови, составляющим по меньшей мере 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 15 ч, 18 ч, 24 ч или больше, с пониженной токсичностью. В некоторых случаях конъюгат IL-2 характеризуется увеличенными периодом полужизни в плазме крови от приблизительно 1 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 1 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 12 ч или от приблизительно 8 ч до приблизительно 10 ч с пониженной токсичностью. В некоторых случаях пониженная токсичность понижена в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз или больше по сравнению с альдеслейкином. В некоторых случаях пониженная токсичность понижена на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше по сравнению с альдеслейкином.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 содержит конъюгирующий фрагмент, при этом размер (например, объем или длина) конъюгирующего фрагмента обеспечивает повышение стабильности в плазме крови, но не снижает эффективность. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента увеличивает период полужизни в плазме крови на по меньшей мере 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 15 ч, 18 ч, 24 ч, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента увеличивает период полужизни в плазме крови на по меньшей мере 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 15 ч, 18 ч, 24 ч или больше. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента обеспечивает увеличение периода полужизни в плазме крови от приблизительно 1 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 1 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 12 ч или от приблизительно 8 ч до приблизительно 10 ч. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента снижает эффективность на менее чем 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше по сравнению с альдеслейкином.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 содержит конъюгирующий фрагмент, при этом размер (например, объем или длина) конъюгирующего фрагмента обеспечивает повышение стабильности в плазме крови и эффективность. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента увеличивает период полужизни в плазме крови на по меньшей мере 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 15 ч, 18 ч, 24 ч, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента увеличивает период полужизни в плазме крови на по меньшей мере 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 15 ч, 18 ч, 24 ч или больше. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента обеспечивает увеличение периода полужизни в плазме крови от приблизительно 1 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 1 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 2 часов до приблизительно 10 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 12 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 10 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 18 ч, от приблизительно 8 ч до приблизительно 12 ч или от приблизительно 8 ч до приблизительно 10 ч. В некоторых случаях размер конъюгирующего фрагмента дополнительно повышает эффективность на более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% или больше по сравнению с альдеслейкином.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан конъюгат IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, ковалентно присоединенную к конъюгирующему фрагменту, при этом неприродная аминокислота расположена в участке 35-107, и при этом участок 35-107 соответствует остаткам K35-Y107 в последовательности под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан белок, связывающий Рурецептор интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$), где аффинность связывания в отношении α -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α) у указанного связывающего белка меньше, чем у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа, где аффинность связывания в отношении α -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α) у указанного связывающего белка меньше, чем у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан белок, связывающий $\beta\gamma$ -рецептор интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$), где аффинность связывания в отношении α -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α) у указанного связывающего белка мень-

ше, чем у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа, и где указанный связывающий белок содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях указанный связывающий белок представляет собой модифицированный полипептид IL-2 или его функционально активный фрагмент, где модифицированный полипептид IL-2 содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях по меньшей мере одна неприродная аминокислота расположена в участке 35-107, и при этом участок 35-107 соответствует остаткам K35-Y107 в последовательности под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию, и IL-2R $\beta\gamma$, где модифицированный полипептид IL-2 характеризуется сниженной аффинностью связывания в отношении IL-2R α , и где сниженную аффинность связывания сравнивают с аффинностью связывания между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к сайту мутации. В некоторых случаях сайт мутации содержит аминокислоту, мутированную в природную аминокислоту. В некоторых случаях сайт мутации содержит аминокислоту, мутированную в остаток цистеина. В других случаях сайт мутации содержит аминокислоту, мутированную в остаток лизина.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\beta\gamma$, где модифицированный полипептид IL-2 характеризуется сниженной аффинностью связывания в отношении IL-2R α , и где сниженную аффинность связывания сравнивают с аффинностью связывания между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к неприродной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\beta\gamma$, где модифицированный полипептид IL-2 характеризуется сниженной эффективностью рецепторной передачи сигнала к IL-2R α , и где сниженную эффективность рецепторной передачи сигнала сравнивают с эффективностью рецепторной передачи сигнала между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к неприродной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан активатор CD4⁺ хелперной клетки, CD8⁺ эффекторной наивной и Т-клетки памяти, натуральной киллерной (NK) клетки или натуральной киллерной Т-клетки (NKT), который селективно обеспечивает размножение CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, NK-клеток, NKT-клеток или их комбинации в клеточной популяции, где указанный активатор содержит модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну мутацию. В некоторых случаях мутация представляет собой мутацию в природную аминокислоту. В других случаях мутация представляет собой мутацию в неприродную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан активатор CD4⁺ хелперной клетки, CD8⁺ эффекторной наивной и Т-клетки памяти, натуральной киллерной (NK) клетки или натуральной киллерной Т-клетки (NKT), который селективно обеспечивает размножение CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, NK-клеток, NKT-клеток или их комбинации в клеточной популяции, где указанный активатор содержит модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях указанный активатор обеспечивает экспансию CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) на менее чем 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или менее чем 0,1% при контакте указанного активатора с указанной популяцией CD3⁺ клеток по сравнению с размножением CD4⁺ Treg-клеток в популяции CD3⁺ клеток при контакте с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях указанный активатор не обеспечивает размножение Treg-клеток в указанной клеточной популяции. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *in vivo* клеточную популяцию. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *in vitro* клеточную популяцию. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *ex vivo* клеточную популяцию.

В некоторых случаях в данном документе также описан способ размножения популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных Т-клеток (NKT), включающий приведение в контакт указанной клеточной популяции с терапевтически эффективным количеством активатора CD4⁺ хелперной клетки, CD8⁺ эффекторной наивной и Т-клетки памяти, натуральной киллерной (NK) клетки или натуральной киллерной Т-клетки (NKT), при этом указанный активатор содержит модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну мутацию, за счет чего обеспечивается размножение популяции CD4⁺ хелперных клеток, CD8⁺ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных Т-клеток (NKT). В некоторых случаях мутация представляет собой мутацию в природную аминокислоту. В других случаях мутация представляет собой мутацию в неприродную аминокислоту. В некоторых случаях в данном документе также описан способ размноже-

ния популяции CD4+ хелперных клеток, CD8+ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных Т-клеток (NKT), включающий приведение в контакт указанной клеточной популяции с терапевтически эффективным количеством активатора CD4+ хелперной клетки, CD8+ эффекторной наивной и Т-клетки памяти, натуральной киллерной (NK) клетки или натуральной киллерной Т-клетки (NKT), при этом указанный активатор содержит модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, за счет чего обеспечивается размножение популяции CD4+ хелперных клеток, CD8+ эффекторных наивных и Т-клеток памяти, натуральных киллерных (NK) клеток или натуральных киллерных Т-клеток (NKT).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в положении K35, соответствующем положению остатка 35 в SEQ ID NO: 1, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 55000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет и не оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в остатке T37, соответствующем положению 37 в SEQ ID NO: 1, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 55000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет и не оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное свя-

зывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент соединен с аминокислотным остатком, выбранным из положения аминокислоты A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 и T113. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 и Q126. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, K9 и H16. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из Q22, N26, N88 и Q126. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из E15, D20, D84 и E95. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из L12, L19 и M23. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из Q22 и N26. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой K8. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой K9. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой Q11. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L12. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой E15. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой H16. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L18. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L19. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой D20. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой Q22. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой M23. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N26. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой R81. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой D84. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой S87. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N88. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой V91. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой I92. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L94. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой E95. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой E116. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N119. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой R120. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой T123. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой A125. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой Q126. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой S127. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой S130. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой T131. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L132. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой T133.

В некоторых случаях конъюгат IL-2 дополнительно содержит дополнительную мутацию. В таких случаях аминокислота конъюгирована с дополнительным конъюгирующим фрагментом для увеличения периода полужизни в сыворотке крови, стабильности или их комбинации. В качестве альтернативы перед связыванием с дополнительным конъюгирующим фрагментом аминокислоту сначала подвергают мутации в природную аминокислоту, такую как лизин, цистеин, гистидин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, треонин или тирозин, или в неприродную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 характеризуется сниженной аффинностью связывания с субъединицей рецептора IL-2 β (IL-2R β), субъединицей рецептора IL-2 γ (IL-2R γ) или их комбинацией комплекса IL-2R $\alpha\beta\gamma$ по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях сниженная аффинность конъюгата IL-2 в отношении субъединицы рецептора IL-2 β (IL-2R β), субъединицы рецептора IL-2 γ (IL-2R γ) или их комбинации по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа составляет приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или более чем 99%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 10%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 20%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 40%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 50%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 60%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 80%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 90%. В некоторых случаях снижение аффинности составляет приблизительно 99%. В некото-

рецепторной передачи сигнала является приблизительно 1000-кратным.

В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала измеряют с помощью значения EC50. В некоторых случаях снижение эффективности рецепторной передачи сигнала приводит к повышению EC50. В некоторых случаях повышение EC50 является приблизительно 1-кратным, 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 6-кратным, 7-кратным, 8-кратным, 9-кратным, 10-кратным, 30-кратным, 50-кратным, 100-кратным, 200-кратным, 300-кратным, 400-кратным, 500-кратным, 1000-кратным или больше по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

В некоторых случаях эффективность рецепторной передачи сигнала измеряют с помощью значения ED50. В некоторых случаях снижение эффективности рецепторной передачи сигнала приводит к повышению ED50. В некоторых случаях повышение ED50 является приблизительно 1-кратным, 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 6-кратным, 7-кратным, 8-кратным, 9-кратным, 10-кратным, 30-кратным, 50-кратным, 100-кратным, 200-кратным, 300-кратным, 400-кратным, 500-кратным, 1000-кратным или больше по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2, описанный в данном документе, характеризуется расширенным терапевтическим окном по сравнению с терапевтическим окном полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях расширенное терапевтическое окно обусловлено снижением связывания между полипептидом IL-2 и $\beta\gamma$ -рецептором интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$), снижением эффективности рецепторной передачи сигнала к IL-2R $\beta\gamma$, снижением рекрутинга субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β или повышением рекрутинга субъединицы IL-2R α в полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 не характеризуется ухудшенной активацией $\alpha\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$, и при этом различие между эффективностью в передаче сигнала первого рецептора и эффективностью в передаче сигнала второго рецептора является по меньшей мере 1-кратным. В некоторых случаях различие является по меньшей мере 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 6-кратным, 7-кратным, 8-кратным, 9-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 30-кратным, 40-кратным, 50-кратным, 60-кратным, 70-кратным, 80-кратным, 90-кратным, 100-кратным, 200-кратным, 300-кратным, 400-кратным, 500-кратным, 1000-кратным или большим. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора меньше эффективности в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора меньше эффективности в передаче сигнала второго рецептора в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз или больше. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 характеризуется более низкой эффективностью рецепторной передачи сигнала к комплексу передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора модифицированного полипептида IL-2 в по меньшей мере 1 раз ниже, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях эффективность в передаче сигнала первого рецептора модифицированного полипептида IL-2 ниже в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз или 500 раз, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях и эффективность в передаче сигнала первого рецептора, и эффективность в передаче сигнала второго рецептора ниже соответствующих эффективностей полипептида IL-2 дикого типа, но эффективность в передаче сигнала первого рецептора ниже эффективности в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых случаях различие между эффективностью в передаче сигнала первого рецептора и эффективностью в передаче сигнала второго рецептора увеличивает терапевтическое окно для модифицированного полипептида IL-2.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент ухудшает или блокирует эффективность рецепторной передачи сигнала IL-2 с IL-2R $\beta\gamma$ или снижает рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β .

В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 с понижением эффективности рецепторной передачи сигнала к IL-2R $\beta\gamma$ способен обеспечивать размножение CD4+ регуляторных T-клеток (Treg).

В некоторых вариантах осуществления пролиферация CD4+ Treg-клеток комплексом модифицированный IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ эквивалентна или превышает таковую у полипептида IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ индуцирует пролиферацию CD4+ Treg-клеток в популяцию, чего достаточно для модуляции течения заболевания в животной модели.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан белок, связывающий $\alpha\beta\gamma$ -рецептор интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), где эффективность рецепторной передачи сигнала для $\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$) у указанного связывающего белка меньше таковой у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа, и где указанный связывающий белок содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях указанный связывающий белок представляет собой моди-

фицированный полипептид IL-2 или его функционально активный фрагмент, где модифицированный полипептид IL-2 содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан белок, связывающий $\alpha\beta\gamma$ -рецептор интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), где рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β указанным связывающим белком меньше такового у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа, и где указанный связывающий белок содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях указанный связывающий белок представляет собой модифицированный полипептид IL-2 или его функционально активный фрагмент, где модифицированный полипептид IL-2 содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан белок, связывающий $\alpha\beta\gamma$ -рецептор интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), где аффинность связывания в отношении $\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$) у указанного связывающего белка меньше таковой у человеческого IL-2 (hIL-2) дикого типа, и где указанный связывающий белок содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В таких случаях указанный связывающий белок представляет собой модифицированный полипептид IL-2 или его функционально активный фрагмент, где модифицированный полипептид IL-2 содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\alpha\beta\gamma$, где модифицированный полипептид IL-2 характеризуется сниженной эффективностью рецепторной передачи сигнала к IL-2R $\beta\gamma$, и где сниженную эффективность рецепторной передачи сигнала сравнивают с аффинностью связывания между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R $\beta\gamma$. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к неприродной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\alpha\beta\gamma$, где рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β указанным модифицированным полипептидом IL-2 меньше такового у полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к неприродной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\alpha\beta\gamma$, где модифицированный полипептид IL-2 характеризуется сниженной аффинностью связывания в отношении IL-2R $\beta\gamma$, и где сниженную аффинность связывания сравнивают с аффинностью связывания между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R $\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$, содержащий модифицированный полипептид IL-2, содержащий неприродную аминокислоту, и IL-2R $\alpha\beta\gamma$, где рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β указанным модифицированным полипептидом IL-2 меньше такового у полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 дополнительно содержит конъюгирующий фрагмент, ковалентно присоединенный к неприродной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан активатор CD4⁺ Treg-клеток, который селективно обеспечивает размножение CD4⁺ Treg-клеток в клеточной популяции, где указанный активатор содержит модифицированный полипептид IL-2, содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых случаях указанный активатор обеспечивает размножение CD8⁺ эффекторной Т-клетки и/или натуральных киллерных клеток на менее чем 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, или 0,1% в популяции CD3⁺ клеток при контакте указанного активатора с указанной популяцией CD3⁺ клеток по сравнению с размножением CD8⁺ эффекторной Т-клетки и/или натуральных киллерных клеток в популяции CD3⁺ клеток при контакте с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *in vivo* клеточную популяцию. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *in vitro* клеточную популяцию. В некоторых случаях указанная клеточная популяция представляет собой *ex vivo* клеточную популяцию.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в остатке K8, соответствующем положению 8 в SEQ ID NO: 3, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вари-

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в остатке D108 и N87, соответствующем положениям 108 и 87 SEQ ID NO: 3, соответственно, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 55000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет и не оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в остатке V91, соответствующем положению 91 в SEQ ID NO: 3, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 55000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет и не оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

Предшественники конъюгата цитокина.

В данном документе описаны предшественники конъюгата цитокина, содержащие мутантный цитокин (такой как IL-2), в котором одна или несколько аминокислот были мутированы из аминокислоты

дикого типа. Такие предшественники часто применяют в раскрытых в данном документе способах для лечения заболеваний или состояний. В некоторых вариантах осуществления предшественник цитокина не конъюгирован. Такие мутации различным образом включают добавления, делеции или замены. В некоторых вариантах осуществления мутация включает замену другой природной аминокислотой. В некоторых случаях мутантный цитокин содержит мутацию в положении аминокислоты P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90 и E99. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90 и E99. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R и N118. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29 и Y30. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из E14, H15, L17 и L18. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10. В некоторых случаях положение аминокислоты выбрано из D19, M22, N25 и N87. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой K8. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой H15. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой L18. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой D19. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой M22. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N25. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N87. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой E99. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N118. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой T122. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой Q125. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой S126. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой T130. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой N87 и D108. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой V90. В некоторых случаях положение аминокислоты представляет собой D108. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит конъюгирующий фрагмент, где конъюгирующий фрагмент присоединяется к мутантному сайту в мутантном цитокине.

Мутантные цитокины, описанный в данном документе, часто содержат одну или несколько мутаций в природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15K. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15C. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15A. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15I. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15L. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15Y. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15W. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15N. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15R. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15D. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15Q. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15G. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15H. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15M. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15F. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15P. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15S. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15T. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию H15V.

Мутантные цитокины, описанный в данном документе, часто содержат одну или несколько мутаций в природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию N87K. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию N87C. В некоторых вариантах осуществления мутантный цитокин содержит SEQ ID NO: 3 и мутацию N87A. В некоторых вариантах осуществления мутантный ци-

жит цитокин (например, IL-2 или другой цитокин), который слит с пептидом или белком (слияние). В некоторых вариантах осуществления пептид или белок представляет собой антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина, описанный в данном документе, содержит цитокин (например, IL-2 или другой цитокин), который слит с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления цитокин, описанный в данном документе, слит с несколькими белками или пептидами. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина содержит слитую конструкцию на основе цитокина и белка или пептида и по меньшей мере один конъюгирующий фрагмент. В некоторых случаях антитело или его связывающие фрагменты предусматривают гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент, мышинное антитело или его связывающий фрагмент, химерное антитело или его связывающий фрагмент, моноклональное антитело или его связывающий фрагмент, моновалентный Fab', бивалентный Fab₂, F(ab)'₃-фрагменты, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантитело, мини-антитело, наноантитело, триантитело, тетра-антитело, гума-антитело, дисульфид-стабилизированный белок Fv (dsFv), однодоменное антитело (sdAb), Ig NAR, верблюжье антитело или его связывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его связывающий фрагмент или их химически модифицированное производное. Такие слитые белки в некоторых случаях получают прямо посредством трансляции. В некоторых вариантах осуществления слитые конструкции получают с использованием химического или другого способа ферментативного лигирования. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина содержит слитый пептид или белок, присоединенный посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептид. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина содержит пептид или белок, слитые на N-конце. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина содержит пептид или белок, слитый на C-конце. В некоторых случаях цитокин, слитый с пептидом или белком, дополнительно конъюгирован с одним или несколькими конъюгирующими фрагментами, описанными ниже.

В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с scFv, бис-scFv, (scFv)₂, dsFv или слияние с sdAb. В некоторых случаях слияние предусматривает scFv. В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с бис-scFv. В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с (scFv)₂. В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с dsFv. В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с sdAb. В некоторых случаях цитокин, слитый с scFv, бис-scFv, (scFv)₂, dsFv или sdAb, дополнительно конъюгирован с одним или несколькими конъюгирующими фрагментами, описанными ниже.

В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с Fc-частью антитела, например, IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых случаях конъюгат цитокина предусматривает слияние с Fc-частью IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄). В некоторых случаях цитокин, слитый с Fc-частью, дополнительно конъюгирован с одним или несколькими конъюгирующими фрагментами, описанными ниже.

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) слит с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых случаях полипептид цитокина слит с гуманизированным антителом или его связывающим фрагментом, мышинным антителом или его связывающим фрагментом, химерным антителом или его связывающим фрагментом, моноклональным антителом или его связывающим фрагментом, моновалентным Fab', бивалентным Fab₂, F(ab)'₃-фрагментами, одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантителом, мини-антителом, наноантителом, триантителом, тетра-антителом, гума-антителом, дисульфид-стабилизированным белком Fv (dsFv), однодоменным антителом (sdAb), Ig NAR, верблюжьим антителом или его связывающим фрагментом, биспецифическим антителом или его связывающим фрагментом или их химически модифицированным производным. В дополнительных случаях полипептида цитокина слит с Fc-частью антитела. В дополнительных случаях полипептида цитокина слит с Fc-частью IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄). В некоторых случаях цитокин, слитый с антителом или его связывающими фрагментами, дополнительно конъюгирован с одним или несколькими конъюгирующими фрагментами, описанными ниже.

В некоторых случаях полипептид IL-2 слит с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых случаях полипептид IL-2 слит с гуманизированным антителом или его связывающим фрагментом, мышинным антителом или его связывающим фрагментом, химерным антителом или его связывающим фрагментом, моноклональным антителом или его связывающим фрагментом, моновалентным Fab', бивалентным Fab₂, F(ab)'₃-фрагментами, одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантителом, мини-антителом, наноантителом, триантителом, тетра-антителом, гума-антителом, дисульфид-стабилизированным белком Fv (dsFv), однодоменным антителом (sdAb), Ig NAR, верблюжьим антителом или его связывающим фрагментом, биспецифическим антителом или его связывающим фрагментом или их химически модифицированным производным. В дополнительных случаях полипептид IL-2 слит с Fc-частью антитела. В дополнительных случаях полипептид IL-2 слит с Fc-частью IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄). В некоторых случаях полипептид IL-2, слитый с антителом или его связывающими фрагментами, дополнительно конъюгирован с одним или несколькими конъюгирующими фрагментами, описанными ниже.

Природные и не природные аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, описанный в данном документе

(например, в цитокине, таком как IL-2), мутирован в лизин, цистеин, гистидин, аргинин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин или тирозин до связывания (или осуществлением реакции) с конъюгирующим фрагментом. Например, боковая цепь лизина, цистеина, гистидина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина или тирозина может связываться с конъюгирующим фрагментом, описанным в данном документе. В некоторых случаях аминокислотный остаток мутирован в цистеин, лизин или гистидин. В некоторых случаях аминокислотный остаток мутирован в цистеин. В некоторых случаях аминокислотный остаток мутирован в лизин. В некоторых случаях аминокислотный остаток мутирован в тирозин. В некоторых случаях аминокислотный остаток мутирован в триптофан. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота не конъюгирована с конъюгирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления цитокин, описанный в данном документе, содержит неприродную аминокислоту, где цитокин конъюгирован с белком, при этом точка присоединения не представляет собой неприродную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, описанный в данном документе (например, в цитокине, таком как IL-2), мутирован в неприродную аминокислоту до связывания с конъюгирующим фрагментом. В некоторых случаях мутация в неприродную аминокислоту предотвращает или минимизирует ответ иммунной системы на аутоантиген. Используемый в данном документе термин "неприродная аминокислота" или "неканоническая аминокислота" относится к аминокислоте, отличной от 20 аминокислот, которые встречаются в природе в белке. Неограничивающие примеры неприродных аминокислот включают п-ацетил-L-фенилаланин, п-йод-L-фенилаланин, п-метоксифенилаланин, O-метил-L-тирозин, п-пропаргилоксифенилаланин, п-пропаргилфенилаланин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAc-серин, L-дофу, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, о-азидо-L-фенилаланин, м-азидо-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, п-боронфенилаланин, O-пропаргилтирозин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфонотирозин, п-бромфенилаланин, селеноцистеин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, N₆-(2-азидоэтокси)карбонил-L-лизин (AzK, химическая структура которого показана в виде соединения 90 на фиг. 3C), неприродный аналог аминокислоты тирозина; неприродный аналог аминокислоты глутамин; неприродный аналог аминокислоты фенилаланина; неприродный аналог аминокислоты серина; неприродный аналог аминокислоты треонина; аминокислоту, замещенную алкилом, арилом, ацилом, азидо-, циано-, галогеном, гидразином, гидразидом, гидроксилом, алкенилом, алкинилом, простым эфиром, тиолом, сульфонилом, селено-, сложным эфиром, тиокислотой, боратом, боронатом, фосфо-, фосфоно-, фосфином, гетероциклом, еноном, имином, альдегидом, гидроксиламином, кето- или amino- или их комбинацию; аминокислоту с фотоактивируемым кросс-линкером; спин-меченую аминокислоту; флуоресцентную аминокислоту; связывающуюся с металлом аминокислоту; металлсодержащую аминокислоту; радиоактивную аминокислоту; фотоэкранированную и/или фотоизомеризуемую аминокислоту; аминокислоту, содержащую биотин или аналог биотина; кетосодержащую аминокислоту; аминокислоту, содержащую полиэтиленгликоль или полиэфир; аминокислоту, замещенную тяжелым атомом; химически расщепляемую или фоторасщепляемую аминокислоту; аминокислоту с удлиненной боковой цепью; аминокислоту, содержащую токсичную группу; замещенную сахаром аминокислоту; аминокислоту, содержащую углерод-связанный сахар; редокс-активную аминокислоту; α -гидрокси-содержащую кислоту; аминокислоту; α , α -двухзамещенную аминокислоту; β -аминокислоту; циклическую аминокислоту, отличную от пролина или гистидина, и ароматическую аминокислоту, отличную от фенилаланина, тирозина или триптофана.

В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота содержит селективную реакционноспособную группу или реакционноспособную группу для сайт-селективного мечения целевого полипептида. В некоторых случаях химия представляет собой биортогональную реакцию (например, биосовместимые и селективные реакции). В некоторых случаях химия представляет собой Cu(I)-катализируемую или "не требующую участия меди" алкин-азидную реакцию образования триазолов, лигирование по Штаудингеру, реакцию Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDDA), "фото-клик"-химию или опосредованный металлом процесс, такой как метатезис олефинов и кросс-сочетание Сузуки-Мияуры или Соногаширы.

В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота содержит фотореактивную группу, которая сшивается при облучении, например, УФ.

В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота включает фотоэкранированную аминокислоту.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой пара-замещенное, мета-замещенное или орто-замещенное производное аминокислоты.

В некоторых случаях неприродная аминокислота включает п-ацетил-L-фенилаланин, о-азидометил-L-фенилаланин, м-азидометил-L-фенилаланин, п-азидометил-L-фенилаланин (pAMF), п-йод-L-фенилаланин, O-метил-L-тирозин, п-метоксифенилаланин, п-пропаргилоксифенилаланин, о-

пропаргилфенилаланин, м-пропаргилфенилаланин, п-пропаргилфенилаланин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAc-серин, L-допу, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфотирозин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин или изопропил-L-фенилаланин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 3-аминотирозин, 3-нитротирозин, 3,4-дигидроксифенилаланин или 3-йодтирозин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой фенилселеноцистеин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой бензофенон-, кетон-, йодид-, метокси-, ацетил-, бензоил- или азид-содержащее производное фенилаланина.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой бензофенон-, кетон-, йодид-, метокси-, ацетил-, бензоил- или азид-содержащее производное лизина.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит ароматическую боковую цепь.

В некоторых случаях неприродная аминокислота не содержит ароматическую боковую цепь.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит азидогруппу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит группу акцепторов Михаэля. В некоторых случаях группы акцепторов Михаэля включают ненасыщенный фрагмент, способный к образованию ковалентной связи в реакции 1,2-присоединения. В некоторых случаях группы акцепторов Михаэля включают электронодефицитные алкены или алкины. В некоторых случаях группы акцепторов Михаэля включают без ограничения альфа-, бета-ненасыщенные кетоны, альдегиды, сульфоксиды, сульфоны, нитрилы, имины или ароматические соединения.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой дегидроаланин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит альдегидную или кетонную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, содержащее альдегидную или кетонную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, содержащее один или несколько атомов O, N, Se или S в бета-, гамма- или дельта-положении. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, содержащее атомы O, N, Se или S в гамма-положении.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, где атом N в эпсилон-положении заменен на атом кислорода.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, которое представляет собой не встречающийся в природе посттрансляционно модифицированный лизин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой аминокислоту, содержащую боковую цепь, в которой шестой атом от альфа-положения содержит карбонильную группу. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой аминокислоту, содержащую боковую цепь, в которой шестой атом от альфа-положения содержит карбонильную группу, а пятый атом от альфа-положения представляет собой азот. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой аминокислоту, содержащую боковую цепь, в которой седьмой атом от альфа-положения представляет собой атом кислорода.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное серина, содержащее селен. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой селеносерин (2-амино-3-гидроселенопропановую кислоту). В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-3-(фенилселанил)пропановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит селен, где окисление селена приводит к образованию неприродной аминокислоты, содержащей алкен.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит циклооктинильную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит трансциклооктенильную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит норборненильную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит циклопропенильную группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит диазириновую группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота содержит тетразиновую группу.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, в котором азот боковой цепи карбамилирован. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой производное лизина, в котором азот боковой цепи ацилирован. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(трет-бутоксикарбонил)амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(трет-бутоксикарбонил)амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-Вос-N6-метиллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-ацетиллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой пирролизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-трифторацетиллизин. В

некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(бензилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(п-йодбензилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(п-нитробензилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-пролиллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(циклопентилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(циклопентанкарбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(тетрагидрофуран-2-карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(3-этинилтетрагидрофуран-2-карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(2-азидоциклопентилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(2-азидоэтокси)карбонил-лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(2-нитробензилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-{{(2-циклооктилокси)карбонил}амино}гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(2-аминобут-3-иноил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-6-((2-аминобут-3-иноил)окси)гексановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(аллилоксикарбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(бутенил-4-оксикарбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(пентенил-5-оксикарбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((бут-3-ин-1-илокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((пент-4-ин-1-илокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(тиазолидин-4-карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-8-оксонановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-8-оксооктановую кислоту. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(2-оксоацетил)лизин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-пропиониллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-бутириллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(бут-2-еноил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((бицикло[2.2.1]гепт-5-ен-2-илокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((спиро[2.3]гекс-1-ен-5-илметокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-(((4-(1-(трифторметил)циклопроп-2-ен-1-ил)бензил)окси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((бицикло[2.2.1]гепт-5-ен-2-илметокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой цистеиниллизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((1-(6-нитробензо[d][1,3]диоксол-5-ил)этокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((2-(3-метил-3Н-диазиридин-3-ил)этокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((3-(3-метил-3Н-диазиридин-3-ил)пропокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((мета-нитробензилокси)N6-метилкарбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси)карбонил)лизин. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой N6-((циклогепт-3-ен-1-илокси)карбонил)-L-лизин.

В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой 2-амино-3-((((бензилокси)карбонил)амино)метил)селанил)пропановую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью перепрофилированного стоп-кодона амбер, стоп-кодона опал или стоп-кодона охра.

В некоторых вариантах осуществления неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью 4-нуклеотидного кодона.

В некоторых вариантах осуществления неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью перепрофилированного редкого смыслового кодона.

В некоторых вариантах осуществления неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью синтетического кодона, содержащего неприродную нуклеиновую кислоту.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин с помощью ортогональной модифицированной пары синтетаза/тРНК. Такие ортогональные пары содержат неприродную синтетазу, которая способна загружать неприродную тРНК неприродной аминокислотой, при этом минимизируя загрузку а) других эндогенных аминокислот на неприродную тРНК и б) неприродных аминокислот на другие эндогенные тРНК. Такие ортогональные пары содержат тРНК, которые способны загружаться

токин (например, в полипептид IL) с помощью пары RS/tРНК Mj-Tyr. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью пары Mj-TyrRS/tРНК, включают без ограничения пара-замещенные производные фенилаланина, такие как п-аминофенилаланин и п-метоксифенилаланин, мета-замещенные производные тирозина, такие как 3-аминотирозин, 3-нитротирозин, 3,4-дигидроксифенилаланин и 3-йодтирозин, фенилселеноцистеин, п-борфенилаланин и о-нитробензилтирозин.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью пары Ec-Tyr/tРНК_{CUA} или Ec-Leu/tРНК_{CUA}.

Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью пары Ec-Tyr/tРНК_{CUA} или Ec-Leu/tРНК_{CUA}, включают без ограничения производные фенилаланина, содержащие бензофеноновые, кетоновые, йодидные или азидные заместители; О-пропаргилтирозин; α-аминокаприловую кислоту, О-метилтирозин, О-нитробензилцистеин и 3-(нафталин-2-иламино)-2-аминопропановую кислоту.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью пары пирролизил-тРНК. В некоторых случаях PylRS получают из археобактерии, например, из метаногенной археобактерии. В некоторых случаях PylRS получают из *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* или *Methanosarcina acetivorans*. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью пары пирролизил-тРНК, включают без ограничения амид- и карбамат-замещенные лизины, такие как 2-амино-6-((R)-тетрагидрофуран-2-карбоксамидо)гексановая кислота, N-ε-D-пролил-L-лизин и N-ε-циклопентилоксикарбонил-L-лизин; N-ε-акрилоил-L-лизин; N-ε-[(1-(6-нитробензо[d][1,3]диоксол-5-ил)этоксикарбонил)-L-лизин и N-ε-(1-метилциклопро-2-ен-карбоксамидо)лизин]. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, могут быть получены путем применения Pyl тРНК M. *mazei*, которая селективно нагружается неприродной аминокислотой, такой как N6-((2-азидэтокси)карбонил)-L-лизин (AzK), с помощью пирролизил-тРНК-синтетазы M. *barkeri* (Mb PylRS). Специалистам в данной области техники известны и другие способы, как, например, способы, раскрытые в Zhang et al., Nature 2017, 551(7682): 644-647.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин, описанный в данном документе (например, полипептид IL), с помощью синтетазы, раскрытой в US 9988619 и US 9938516. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью таких синтетаз, предусматривают параметилазидо-L-фенилаланин, неприродные аминокислоты, содержащие аралкил, гетероциклил, гетероаралкил, и другие. В некоторых вариантах осуществления такие UAA включают пиридил, пиазинил, пиазолил, триазолил, оксазолил, тиазолил, тиофенил или другой гетероцикл. Такие аминокислоты в некоторых вариантах осуществления содержат азиды, тетразины или другую химическую группу, способную к конъюгации с партнером по сочетанию, таким как водорастворимый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления такие синтетазы экспрессируются и применяются для встраивания UAA в цитокины *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие синтетазы применяются для встраивания UAA в цитокины с применением бесклеточной системы трансляции.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин, описанный в данном документе (например, полипептид IL), с помощью встречающейся в природе синтетазы. В некоторых вариантах осуществления неприродную аминокислоту встраивают в цитокин с помощью организма, который является ауксотрофным по одной или нескольким аминокислотам. В некоторых вариантах осуществления синтетазы, соответствующие ауксотрофной аминокислоте, способны загружать соответствующую тРНК неприродной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота представляет собой селеноцистеин или его производное. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота представляет собой селенометионин или его производное. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота представляет собой ароматическую аминокислоту, где ароматическая аминокислота включает арилгалогенид, такой как йодид. В вариантах осуществления неприродная аминокислота структурно подобна ауксотрофной аминокислоте.

В некоторых случаях неприродная аминокислота включает неприродную аминокислоту, показанную на фиг. 1.

В некоторых случаях неприродная аминокислота включает производное или аналог лизина или фенилаланина. В некоторых случаях неприродная аминокислота включает производное лизина или аналог лизина. В некоторых случаях неприродная аминокислота включает пирролизин (Pyl). В некоторых случаях неприродная аминокислота включает производное фенилаланина или аналог фенилаланина. В некоторых случаях неприродная аминокислота представляет собой неприродную аминокислоту, описанную в Wan, et al., "Pyltolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool," Biochim Biophys Acta 1844(6): 1059-4070 (2014). В некоторых случаях неприродная аминокислота включает неприродную аминокислоту, показанную на фиг. 2 (например, фиг. 2А и фиг. 2В).

В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота включает неприродную аминокислоту, показанную на фиг. 3А - фиг. 3D (адаптированы из таблицы 1 из Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69).

В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота, встроенная в цитокин, описанный в данном документе (например, полипептид IL), раскрывается в US 9840493, US 9682934, US

2017/0260137, US 9938516 или US 2018/0086734. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью таких синтетаз, включают пара-метилазидо-L-фенилаланин, аралкил, гетероцикл и гетероаралкил, а также неприродные аминокислоты, представляющие собой производные лизина. В некоторых вариантах осуществления такие UAA включают пиридил, пиразинил, пиразолил, триазолил, оксазолил, тиазолил, тиофенил или другой гетероцикл. Такие аминокислоты в некоторых вариантах осуществления содержат азиды, тетразины или другую химическую группу, способную к конъюгации с партнером по сочетанию, таким как водорастворимый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления UAA включает азид, присоединенный к ароматическому фрагменту посредством алкильного линкера. В некоторых вариантах осуществления алкильный линкер представляет собой линкер C₁-C₁₀. В некоторых вариантах осуществления UAA включает тетразин, присоединенный к ароматическому фрагменту посредством алкильного линкера. В некоторых вариантах осуществления UAA включает тетразин, присоединенный к ароматическому фрагменту посредством аминогруппы. В некоторых вариантах осуществления UAA включает тетразин, присоединенный к ароматическому фрагменту посредством алкиламиногруппы. В некоторых вариантах осуществления UAA включает азид, присоединенный к концевому азоту (например, N6 из производного лизина, или N5, N4 или N3 из производного, содержащего более короткую алкильную боковую цепь) боковой цепи аминокислоты посредством алкильной цепи. В некоторых вариантах осуществления UAA включает тетразин, присоединенный к концевому азоту боковой цепи аминокислоты посредством алкильной цепи. В некоторых вариантах осуществления UAA включает азид или тетразин, присоединенный к амиду посредством алкильного линкера. В некоторых вариантах осуществления UAA представляет собой азид- или тетразинсодержащий карбамат или амид 3-аминоаланина, серина, лизина или их производного. В некоторых вариантах осуществления такие UAA встраивают в цитокины *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие UAA встраивают в цитокины в бесклеточной системе.

Конъюгирующие фрагменты.

В определенных вариантах осуществления в данном документе раскрываются конъюгирующие фрагменты, которые связаны с одним или несколькими цитокинами (например, интерлейкинами, IFN или TNF), описанными выше. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент представляет собой молекулу, которая нарушает взаимодействие цитокина с его рецептором. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент представляет собой любую молекулу, которая при связывании с цитокином позволяет конъюгату цитокина модулировать иммунный ответ. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан с цитокином посредством ковалентной связи. В некоторых случаях описанный в данном документе цитокин присоединен к конъюгирующему фрагменту с помощью триазольной группы. В некоторых случаях описанный в данном документе цитокин присоединен к конъюгирующему фрагменту с помощью дигидропиридазиновой или пиридазиновой группы. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент включает водорастворимый полимер. В других случаях конъюгирующий фрагмент включает белок или его связывающий фрагмент. В дополнительных случаях конъюгирующий фрагмент включает пептид. В дополнительных случаях конъюгирующий фрагмент включает нуклеиновую кислоту. В дополнительных случаях конъюгирующий фрагмент включает небольшую молекулу. В дополнительных случаях конъюгирующий фрагмент включает биоконъюгат (например, агонист TLR, такой как агонист TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9; или синтетический лиганд, такой как Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, поли I:C, поли A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA или флагеллин). В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент увеличивает время полужизни в сыворотке крови и/или улучшает стабильность. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент снижает взаимодействие цитокина с одним или несколькими доменами или субъединицами рецептора цитокина. В дополнительных случаях конъюгирующий фрагмент блокирует взаимодействие цитокина с одним или несколькими доменами или субъединицами своего (своих) когнатного (когнатных) рецептора (рецепторов) цитокина. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конъюгаты цитокина содержат несколько конъюгирующих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент присоединен к неприродной или природной аминокислоте в пептиде цитокина. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина содержит конъюгирующий фрагмент, присоединенный к природной аминокислоте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина присоединен к неприродной аминокислоте в пептиде цитокина. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент присоединен к N- или C-концевой аминокислоте пептида цитокина. В данном документе раскрыты различные комбинации сайтов, например, первый конъюгирующий фрагмент присоединен к неприродной или природной аминокислоте в пептиде цитокина, а второй конъюгирующий фрагмент присоединен к N- или C-концевой аминокислоте пептида цитокина. В некоторых вариантах осуществления один конъюгирующий фрагмент присоединен к нескольким остаткам пептида цитокина (например, к петле). В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент присоединен как к N-, так и к C-концевой аминокислоте пептида цитокина.

Водорастворимые полимеры.

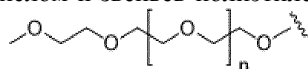
В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгирующий фрагмент представляет собой водорастворимый полимер. В некоторых случаях водорастворимый полимер являет-

ся непептидным, нетоксическим и биологически совместимым. В контексте данного документа вещество считается биологически совместимым, если полезные эффекты, связанные с применением вещества отдельно или вместе с другим веществом (например, активным средством, таким как фрагмент цитокина) в сочетании с живыми тканями (например, при введении пациенту), превосходят любые вредные эффекты по оценке клинициста, например, врача, токсиколога или специалиста по клинической разработке. Кроме того, в некоторых случаях водорастворимый полимер является неиммуногенным. В некоторых случаях вещество считается неиммуногенным, если предполагаемое применение вещества *in vivo* не вызывает нежелательный иммунный ответ (например, антителообразование) или, если иммунный ответ возникает, то такой ответ не считается клинически значимым или важным по оценке клинициста, например, врача, токсиколога или специалиста по клинической разработке.

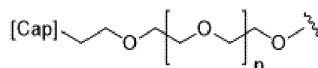
В некоторых случаях водорастворимый полимер характеризуется наличием от приблизительно 2 до приблизительно 300 концов. Иллюстративные водорастворимые полимеры включают без ограничения поли(алкиленгликоли), такие как полиэтиленгликоль ("PEG"), поли(пропиленгликоль) ("PPG"), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля и т.п., поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислота), поли(виниловый спирт) (PVA), полиакриламид (PAAm), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламид) (PHPMa), полиметилакриламид (PDAAm), полифосфазен, полиоксазолины ("POZ") (которые описаны в WO 2008/106186), поли(N-акрилоилморфолин) и комбинации любых из вышеперечисленных.

В некоторых случаях водорастворимый полимер не ограничен конкретной структурой. В некоторых случаях водорастворимый полимер является линейным (например, кэпированным на конце, например, алкокси-PEG или бифункциональный PEG), разветвленным или многолучевым (например, раздвоенный PEG или PEG, присоединенный к ядру полиола), характеризуется дендритным (или звездчатым) строением, каждый с одной или несколькими разрушаемыми связями или без них. Более того, внутренняя структура водорастворимого полимера может быть организована в виде любого количества различных повторяющихся паттернов и может быть выбрана из группы, состоящей из гомополимера, чередующегося сополимера, статистического сополимера, блок-сополимера, чередующегося триполимера, статистического триполимера и блок-триполимера.

В некоторых случаях водорастворимый полимер представлен длиной повторяющихся полимерных звеньев, например, числом n звеньев полиэтиленгликоля. В некоторых случаях водорастворимый поли-



мер имеет структуру , где волнистой линией показано присоединение к линкеру, реакционноспособной группе или неприродной аминокислоте, и n составляет 1-5000. В некоторых



случаях водорастворимый полимер имеет структуру , где волнистой линией показано присоединение к линкеру, реакционноспособной группе или неприродной аминокислоте, "Cap" представляет собой кэпирующую группу (например, такую как $-\text{OCH}_3$, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-алкил})$, $-\text{SMe}$, $-\text{S}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-алкил})$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-алкил})$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-алкил})$, $-\text{CON}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-алкил})_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ или OH), и n составляет 1-5000. В некоторых вариантах осуществления n составляет 100-2000, 200-1000, 300-750, 400-600, 450-550, 400-2000, 750-3000 или 100-750. В некоторых вариантах осуществления n составляет приблизительно 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или приблизительно 1000. В некоторых вариантах осуществления n составляет по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или по меньшей мере 1000. В некоторых вариантах осуществления n составляет не более 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или не более 1000. В некоторых вариантах осуществления n представлен как средняя длина водорастворимого полимера.

В некоторых вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса водорастворимого полимера в конъюгате IL-2 составляет от приблизительно 100 дальтон до приблизительно 150000 дальтон. Иллюстративные диапазоны включают, например, средневесовые молекулярные массы в диапазоне от более 5000 дальтон до приблизительно 100000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 6000 дальтон до приблизительно 90000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от более 10000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 53000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 25000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 29000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 35000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон и в диапазоне от приблизительно 40000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон.

Иллюстративные средневесовые молекулярные массы водорастворимого полимера включают значения, составляющие приблизительно 100 дальтон, приблизительно 200 дальтон, приблизительно 300 дальтон, приблизительно 400 дальтон, приблизительно 500 дальтон, приблизительно 600 дальтон, приблизительно 700 дальтон, приблизительно 750 дальтон, приблизительно 800 дальтон, приблизительно

900 дальтон, приблизительно 1000 дальтон, приблизительно 1500 дальтон, приблизительно 2000 дальтон, приблизительно 2200 дальтон, приблизительно 2500 дальтон, приблизительно 3000 дальтон, приблизительно 4000 дальтон, приблизительно 4400 дальтон, приблизительно 4500 дальтон, приблизительно 5000 дальтон, приблизительно 5500 дальтон, приблизительно 6000 дальтон, приблизительно 7000 дальтон, приблизительно 7500 дальтон, приблизительно 8000 дальтон, приблизительно 9000 дальтон, приблизительно 10000 дальтон, приблизительно 11000 дальтон, приблизительно 12000 дальтон, приблизительно 13000 дальтон, приблизительно 14000 дальтон, приблизительно 15000 дальтон, приблизительно 20000 дальтон, приблизительно 22500 дальтон, приблизительно 25000 дальтон, приблизительно 30000 дальтон, приблизительно 35000 дальтон, приблизительно 40000 дальтон, приблизительно 45000 дальтон, приблизительно 50000 дальтон, приблизительно 55000 дальтон, приблизительно 60000 дальтон, приблизительно 65000 дальтон, приблизительно 70000 дальтон и приблизительно 75000 дальтон. Также можно применять разветвленные варианты водорастворимого полимера (например, разветвленный водорастворимый полимер с молекулярным весом 40000 дальтон, состоящий из двух полимеров с молекулярным весом 20000 дальтон), имеющие общий молекулярный вес любого из вышеперечисленных. В одном или нескольких вариантах осуществления конъюгат не будет содержать каких-либо фрагментов PEG, присоединенных, непосредственно или опосредованно, к PEG, имеющему средневесовой молекулярный вес менее чем приблизительно 6000 дальтон.

Как правило, PEG будут содержать ряд мономеров (OCH₂CH₂) [или мономеров (CH₂CH₂O), в зависимости от того, как определяется PEG]. Применяемое в данном документе количество повторяющихся звеньев обозначается индексом "n" в "(OCH₂CH₂)_n". Таким образом, значение (n) обычно попадает в один или несколько из следующих диапазонов: от 2 до приблизительно 3400, от приблизительно 100 до приблизительно 2300, от приблизительно 100 до приблизительно 2270, от приблизительно 136 до приблизительно 2050, от приблизительно 225 до приблизительно 1930, от приблизительно 450 до приблизительно 1930, от приблизительно 1200 до приблизительно 1930, от приблизительно 568 до приблизительно 2727, от приблизительно 660 до приблизительно 2730, от приблизительно 795 до приблизительно 2730, от приблизительно 795 до приблизительно 2730, от приблизительно 909 до приблизительно 2730 и от приблизительно 1200 до приблизительно 1900. Для любого данного полимера, для которого известен молекулярный вес, можно определить количество повторяющихся звеньев (т.е. "n"), разделив общий средневесовой молекулярный вес полимера на молекулярный вес повторяющегося мономера.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер представляет собой полимер, экзипированный на конце, то есть полимер, имеющий по меньшей мере один конец, экзипированный относительно инертной группой, такой как низшая C₁₋₆алкоксигруппа или гидроксильная группа. Когда полимер представляет собой PEG, например, можно применять метокси-PEG (обычно называемый mPEG), который является линейной формой PEG, где один конец полимера представляет собой метокси(-OCH₃)-группу, тогда как другой конец представляет собой гидроксил или другую функциональную группу, которая необязательно может быть химически модифицирована.

В некоторых вариантах осуществления группа PEG, содержащаяся в конъюгатах PL-2, раскрываемых в данном документе, является линейной или разветвленной группой PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является линейной группой PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является разветвленной группой PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является группой метокси-PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является линейной или разветвленной группой метокси-PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является линейной группой метокси-PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является разветвленной группой метокси-PEG. В некоторых вариантах осуществления группа PEG является линейной или разветвленной группой PEG со средней молекулярной массой от приблизительно 100 дальтон до приблизительно 150000 дальтон. Иллюстративные диапазоны включают, например, средневесовые молекулярные массы в диапазоне от более 5000 дальтон до приблизительно 100000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 6000 дальтон до приблизительно 90000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 10000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от более 10000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 20000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 53000 дальтон до приблизительно 85000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 25000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 29000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон, в диапазоне от приблизительно 35000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон и в диапазоне от приблизительно 40000 дальтон до приблизительно 120000 дальтон. Иллюстративные средневесовые молекулярные массы для группы PEG включают значения, составляющие приблизительно 100 дальтон, приблизительно 200 дальтон, приблизительно 300 дальтон, приблизительно 400 дальтон, приблизительно 500 дальтон, приблизительно 600 дальтон, приблизительно 700 дальтон, приблизительно 750 дальтон, приблизительно 800 дальтон, приблизительно 900 дальтон, приблизительно 1000 дальтон, приблизительно 1500 дальтон, приблизительно 2000 дальтон, приблизительно 2200 дальтон, приблизительно 2500 дальтон, приблизительно 3000 дальтон, приблизительно 4000 дальтон, приблизительно 4400 дальтон, приблизительно 4500 дальтон, приблизительно 5000 дальтон, приблизительно 5500 дальтон, приблизительно 6000 дальтон, приблизительно 7000 дальтон, приблизительно 7500 дальтон, приблизи-

разветвленные или раздвоенные PEG от Nektar Therapeutics и Y-образные производные PEG от JenKem Technology.

В некоторых вариантах осуществления полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанного в данном документе, конъюгирован с водорастворимым полимером, выбранным из поли(алкиленгликолей), с таким как полиэтиленгликоль ("PEG"), поли(пропиленгликоль) ("PPG"), сополимерный этиленгликоля и пропиленгликоля и т.п., поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислота), поли(виниловый спирт) (PVA), полиакриламид (PAAm), полиметилакриламид (PDAAm), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламид) (PHPMa), полифосфазен, полиоксазолины ("POZ"), поли(N-акрилоилморфолин) и их комбинация. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с PEG (например, пегелирован). В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с PPG. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с POZ. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с PVP.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2, описанный в данном документе, конъюгирован с водорастворимым полимером, выбранным из поли(алкиленгликоли), с таким как полиэтиленгликоль ("PEG"), поли(пропиленгликоль) ("PPG"), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля и т.п., поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислота), поли(виниловый спирт) (PVA), полиакриламид (PAAm), полиметилакриламид (PDAAm), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламид) (PHPMa), полифосфазен, полиоксазолины ("POZ"), поли(N-акрилоилморфолин) и их комбинация. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PEG (например, пегелирован). В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PPG. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с POZ. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PVP.

В некоторых случаях водорастворимый полимер включает полиглицерин (PG). В некоторых случаях полиглицерин представляет собой гиперразветвленный PG (HPG) (например, как описано в Imgan, et al. "Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution," *Biomaterials* 33:9135-9147 (2012)). В других случаях полиглицерин представляет собой линейный PG (LPG). В дополнительных случаях полиглицерин представляет собой полуфункциональный PG, линейно-блочно-гиперразветвленный PG (например, как описано в Wurm et. AL, "Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glycerol)-protein conjugates," *Biomacromolecules* 13:1161-1171 (2012)) или PG с функциональными боковыми цепями (например, как описано в Li, et al., "Synthesis of linear polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation," *Bioconjugate Chem.* 20:780-789 (2009)).

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанный в данном документе, конъюгирован с PG, например, HPG, LPG, полуфункциональным PG, линейно-блочно-гиперразветвленным PG или PG с функциональными боковыми цепями. В некоторых случаях цитокин представляет собой полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PG, полуфункциональным PG, линейно-блочно-гиперразветвленным PG.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер представляет собой разрушаемую синтетическую альтернативу PEG. Иллюстративные разрушаемые синтетические альтернативы PEG включают без ограничения поли[олиго(этиленгликоль)метилметакрилат] (POEGMA); производные PEG с модифицированным остовом, полученные с помощью полимеризации телехелатных или функционализированных с обоих концов макромономеров на основе PEG; производные PEG, включающие сомомеры, содержащие разрушаемую связь, такие как сополимер [(этиленоксида) и (метиленэтиленоксида)][P(EO-co-MEO)], циклические ацетали кетена, такие как 5,6-бензо-2-метил-1,3-диоксапан (BMDO), 2-метил-1,3-диоксапан (MDO) и 2-метил-4-фенил-1,3-диоксолан (MPDL), сополимеризованные с OEGMA; или поли(этиленоксид) с привитым поли(ϵ -капролактоном) (PCL-g-PEO).

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанный в данном документе, конъюгирован с разрушаемым синтетическим альтернативным PEG, таким как, например, POEGM; с производными PEG с модифицированным остовом, полученными с помощью полимеризации телехелатных или функционализированных с обоих концов макромономеров на основе PEG; P(EO-co-MEO); циклическими ацеталами кетена, такими как BMDO, MDO и MPDL, сополимеризованные с OEGMA; или PCL-g-PEO. В некоторых случаях цитокин представляет собой полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с разрушаемым синтетическим альтернативным PEG, таким как, например, POEGM; с производными PEG с модифицированным остовом, полученными с помощью полимеризации телехелатных или функционализированных с обоих концов макромономеров на основе PEG; P(EO-co-MEO); циклическими ацеталами кетена, такими как BMDO, MDO и MPDL, сополимеризованные с OEGMA; или PCL-g-PEO.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает поли(цвиттер-ионы). Иллюстративные поли(цвиттер-ионы) включают без ограничения поли(сульфобетаинметакрилат) (PSB-

МА), поли(карбоксиветинметакрилат) (PCBMA) и поли(2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолин) (PMPC). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанный в данном документе, конъюгирован с поли(цвиттер-ионом), таким как PSBMA, PCBMA или PMPC. В некоторых случаях цитокин представляет собой полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с поли(цвиттер-ионом), таким как PSBMA, PCBMA или PMPC.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает поликарбонат. Иллюстративные поликарбонаты включают без ограничения пентафторфенил-5-метил-2-оксо-1,3-диоксан-5-карбоксилат (MTC-OC₆F₅). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанный в данном документе, конъюгирован с поликарбонатом, таким как MTC-OC₆F₅. В некоторых случаях цитокин представляет собой полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с поликарбонатом, таким как MTC-OC₆F₅.

В некоторых вариантах осуществления растворимый в воде полимер предусматривает полимерный гибрид, такой как, например, полимерный гибрид поликарбонат/PEG, конъюгат пептид/белок-полимер или содержащий гидроксил и/или цвиттер-ионный дериватизированный полимер (например, содержащий гидроксил и/или цвиттер-ионный дериватизированный PEG-полимер). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF), описанный в данном документе, конъюгирован с гибридом полимеров, таким как гибрид полимеров поликарбонат/PEG, конъюгат пептид/белок-полимер или гидроксилсодержащий и/или цвиттер-ионный дериватизированный полимер (например, гидроксилсодержащий и/или цвиттер-ионный дериватизированный полимер PEG). В некоторых случаях цитокин представляет собой полипептид IL-2. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с гибридом полимеров, таким как гибрид полимеров поликарбонат/PEG, конъюгат пептид/белок-полимер или гидроксилсодержащий и/или цвиттер-ионный дериватизированный полимер (например, гидроксилсодержащий и/или цвиттер-ионный дериватизированный полимер PEG).

В некоторых случаях водорастворимый полимер включает полисахарид. Иллюстративные полисахариды включают без ограничения декстран, полисиаловую кислоту (PSA), гиалуроновую кислоту (HA), амилозу, гепарин, гепарансульфат (HS), декстрин или гидроксиэтилкрахмал (HES). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с полисахаридом. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с декстраном. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PSA. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с HA. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с амилозой. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с гепарином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с HS. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с декстрином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с HES.

В некоторых случаях водорастворимый полимер включает гликан. Иллюстративные классы гликанов включают N-связанные гликаны, O-связанные гликаны, гликолипиды, O-GlcNAc и гликозаминогликаны. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с гликаном. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с N-связанными гликанами. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с O-связанными гликанами. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с гликолипидами. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с O-GlcNAc. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с гликозаминогликанами.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает полимер полиоксазолина. Полимер полиоксазолина представляет собой линейный синтетический полимер и, как и PEG, характеризуется низкой полидисперсностью. В некоторых случаях полимер полиоксазолин представляет собой полидисперсный полимер полиоксазолин, имеющий среднюю молекулярную массу. В некоторых случаях средняя молекулярная масса полиоксазолинового полимера составляет, например, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10000, 12000, 20000, 35000, 40000, 50000, 60000, 100000, 200000, 300000, 400000 или 500000 Да. В некоторых случаях полимер полиоксазолина предусматривает поли(2-метил-2-оксазолин) (PMOZ), поли(2-этил-2-оксазолин) (PEOZ) или поли(2-пропил-2-оксазолин) (PPOZ). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с полимером полиоксазолином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с полимером полиоксазолином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PMOZ. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PEOZ. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с PPOZ.

В некоторых случаях водорастворимый полимер включает собой полимер на основе полиакриловой кислоты. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с полимером на основе полиакриловой кислоты. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с полимером на основе полиакриловой кислоты.

В некоторых случаях водорастворимый полимер включает полиамин. Полиамин представляет собой органический полимер, содержащий две или более первичные аминогруппы. В некоторых вариантах осуществления полиамин включает разветвленный полиамин, линейный полиамин или циклический полиамин. В некоторых случаях полиамин представляет собой низкомолекулярный линейный полиамин. Иллюстративные полиамины включают путресцин, кадаверин, спермидин, этилендиамин, 1,3-диаминопропан, гексаметилендиамин, тетраэтилметиленидиамин и пиперазин. В некоторых случаях по-

липептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с полиамином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с полиамином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с путресцином, кадаверином, спермидином, спермином, этилендиамином, 1,3-диаминопропаном, гексаметилендиамином, тетраэтилметилендиамином или пиперазином.

В некоторых случаях водорастворимый полимер описан в патентах США № 7744861, 8273833 и 7803777. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с линкером, описанным в патентах США № 7744861, 8273833 или 7803777. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с линкером, описанным в патентах США № 7744861, 8273833 или 7803777.

Липиды.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгирующий фрагмент представляет собой липид. В некоторых случаях липид представляет собой жирную кислоту. В некоторых случаях жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту. В других случаях жирная кислота представляет собой ненасыщенную жирную кислоту. Иллюстративные жирные кислоты включают без ограничения жирные кислоты, содержащие от приблизительно 6 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 24 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 22 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 18 атомов углерода, от приблизительно 20 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 24 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 22 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 20 атомов углерода или от приблизительно 12 до приблизительно 18 атомов углерода. В некоторых случаях липид связывается с одним или несколькими белками сыворотки крови, тем самым повышая стабильность в сыворотке крови и/или время полужизни в сыворотке крови.

В некоторых вариантах осуществления липид конъюгирован с IL-2. В некоторых случаях липид представляет собой жирную кислоту, например, насыщенную жирную кислоту или ненасыщенную жирную кислоту. В некоторых случаях жирная кислота содержит от приблизительно 6 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 24 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 22 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов углерода, от приблизительно 6 до приблизительно 18 атомов углерода, от приблизительно 20 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 26 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 24 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 22 атомов углерода, от приблизительно 12 до приблизительно 20 атомов углерода или от приблизительно 12 до приблизительно 18 атомов углерода. В некоторых случаях жирная кислота содержит приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 атомов углерода в длину. В некоторых случаях жирная кислота предусматривает капроновую кислоту (гексановую кислоту), энантовую кислоту (гептановую кислоту), каприловую кислоту (октановую кислоту), пеларгоновую кислоту (нонановую кислоту), каприновую кислоту (декановую кислоту), ундециловую кислоту (ундекановую кислоту), лауриновую кислоту (додекановую кислоту), тридециловую кислоту (тридекановую кислоту), миристиновую кислоту (тетрадекановую кислоту), пентадециловую кислоту (пентадекановую кислоту), пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту), стеариновую кислоту (октадекановую кислоту), нонадециловую кислоту (нонадекановую кислоту), арахидиновую кислоту (эйкозановую кислоту), генийкозиловую кислоту (генийкозановую кислоту), бегеновую кислоту (докозановую кислоту), трикозиловую кислоту (трикозановую кислоту), лигноцеринговую кислоту (тетракозановую кислоту), пентакозиловую кислоту (пентакозановую кислоту) или церотовую кислоту (гексакозановую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления липидный конъюгат IL-2 повышает стабильность в сыворотке крови и/или время полужизни в сыворотке крови.

Белки.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгирующий фрагмент представляет собой белок или его связывающий фрагмент. Иллюстративные белки включают альбумин, трансферрин или транстиретин. В некоторых случаях белок или его связывающий фрагмент включает предусматривает антитело или его связывающие фрагменты. В некоторых случаях конъюгат цитокина содержит белок или его связывающий фрагмент. В некоторых случаях конъюгат IL-2, содержащий белок или его связывающий фрагмент, характеризуется увеличенным временем полужизни в сыворотке крови и/или повышенной стабильностью. В некоторых случаях конъюгат IL-2, содержащий белок или его связывающий фрагмент, характеризуется сниженным взаимодействием IL-2 с одной или несколькими субъединицами IL-2R. В дополнительных случаях белок или его связывающий фрагмент блокирует взаимодействие IL-2 с одной или несколькими субъединицами IL-2R.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой альбумин. Альбумин представляет собой семейство водорастворимых глобулярных белков. Обычно он обнаруживается в плазме крови, составляя приблизительно 55-60% от всех белков плазмы крови. Человеческий

сывороточный альбумин (HSA) представляет собой полипептид из 585 аминокислот, в котором третичная структура разделена на три домена: домен I (аминокислотные остатки 1-195), домен II (аминокислотные остатки 196-383) и домен III (аминокислотные остатки 384-585). Каждый домен дополнительно содержит сайт связывания, который способен обратимо или необратимо взаимодействовать с эндогенными лигандами, такими как длинно- и среднецепочечные жирные кислоты, билирубин или гемин, или экзогенными соединениями, такими как гетероциклические или ароматические соединения.

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с альбумином. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с человеческим сывороточным альбумином (HSA). В дополнительных случаях полипептид цитокина конъюгирован с функциональным фрагментом альбумина.

В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с альбумином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с человеческим сывороточным альбумином (HSA). В дополнительных случаях полипептид IL-2 конъюгирован с функциональным фрагментом альбумина.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой трансферрин. Трансферрин представляет собой полипептид из 679 аминокислот, который имеет размер приблизительно 80 кДа и содержит два сайта связывания Fe^{3+} , один из которых находится в N-концевом домене, а другой - в C-концевом домене. В некоторых случаях человеческий трансферрин характеризуется временем полужизни, составляющим приблизительно 7-12 дней.

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с трансферрином. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с человеческим трансферрином. В дополнительных случаях полипептид цитокина конъюгирован с функциональным фрагментом трансферрина.

В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с трансферрином. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с человеческим трансферрином. В дополнительных случаях полипептид IL-2 конъюгирован с функциональным фрагментом трансферрина.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой транстретин (TTR). Транстретин представляет собой транспортный белок, расположенный в сыворотке крови и спинномозговой жидкости, который транспортирует тиреоидный гормон тироксин (T_4) и ретинол-связывающий белок, связанный с ретинолом.

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с транстретином (посредством одного из его концов или посредством внутреннего шарнирного участка). В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с функциональным фрагментом транстретина.

В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с транстретином (посредством одного из его концов или посредством внутреннего шарнирного участка). В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с функциональным фрагментом транстретина.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой антитело или его связывающие фрагменты. В некоторых случаях антитело или его связывающие фрагменты предусматривают гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент, мышинное антитело или его связывающий фрагмент, химерное антитело или его связывающий фрагмент, моноклональное антитело или его связывающий фрагмент, моновалентный Fab', бивалентный Fab₂, F(ab)'₃-фрагменты, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантитело, мини-антитело, наноантитело, триантитело, тетра-антитело, гума-антитело, дисульфид-стабилизированный белок Fv (dsFv), однодоменное антитело (sdAb), Ig NAR, верблюжье антитело или его связывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его связывающий фрагмент или их химически модифицированное производное.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит scFv, бис-scFv, (scFv)₂, dsFv или sdAb. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит scFv. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит бис-scFv. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит (scFv)₂. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит dsFv. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит sdAb.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит Fc-часть антитела, например, IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых случаях фрагмент содержит Fc-часть IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄).

В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых случаях полипептид цитокина конъюгирован с гуманизированным антителом или его связывающим фрагментом, мышинным антителом или его связывающим фрагментом, химерным антителом или его связывающим фрагментом, моноклональным антителом или его связывающим фрагментом, моновалентным Fab', бивалентным Fab₂, F(ab)'₃-фрагментами, одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантителом, мини-антителом, наноантителом, триантителом, тетра-антителом, гума-антителом, дисульфид-стабилизированным белком Fv (dsFv), однодоменным антителом (sdAb), Ig NAR, верблюжьим антителом или его связывающим фрагментом, биспецифическим антителом или его связывающим фрагментом или их химически модифицированным производным. В дополнительных случаях полипептид цитокина

конъюгирован с Fc-частью антитела. В дополнительных случаях полипептид цитокина конъюгирован с Fc-частью IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄).

В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с гуманизированным антителом или его связывающим фрагментом, мышинным антителом или его связывающим фрагментом, химерным антителом или его связывающим фрагментом, моноклональным антителом или его связывающим фрагментом, мовалентным Fab', бивалентным Fab₂, F(ab)₃-фрагментами, одноцепочечным вариательным фрагментом (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантителом, мини-антителом, наноантителом, триантителом, тетра-антителом, гума-антителом, дисульфид-стабилизированным белком Fv (dsFv), однодоменным антителом (sdAb), Ig NAR, верблюжьим антителом или его связывающим фрагментом, биспецифическим антителом или его связывающим фрагментом или их химически модифицированным производным. В дополнительных случаях полипептид IL-2 конъюгирован с Fc-частью антитела. В дополнительных случаях полипептид IL-2 конъюгирован с Fc-частью IgG (например, IgG₁, IgG₃ или IgG₄).

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2 конъюгирован с водорастворимым полимером (например, PEG) и антителом или его связывающим фрагментом. В некоторых случаях антитело или его связывающие фрагменты предусматривают гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент, мышинное антитело или его связывающий фрагмент, химерное антитело или его связывающий фрагмент, моноклональное антитело или его связывающий фрагмент, мовалентный Fab', бивалентный Fab₂, F(ab)₃-фрагменты, одноцепочечный вариательный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, диантитело, мини-антитело, наноантитело, триантитело, тетра-антитело, гума-антитело, дисульфид-стабилизированный белок Fv (dsFv), однодоменное антитело (sdAb), Ig NAR, верблюжье антитело или его связывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его связывающий фрагмент или их химически модифицированное производное. В некоторых случаях антитело или его связывающие фрагменты предусматривают scFv, бис-scFv, (scFv)₂, dsFv или sdAb. В некоторых случаях антитело или его связывающие фрагменты предусматривают scFv. В некоторых случаях антитело или его связывающий фрагмент направляет конъюгат IL-2 к представляющей интерес целевой клетке, а водорастворимый полимер повышает его стабильность и/или время полужизни в сыворотке крови.

В некоторых случаях один или несколько конъюгатов полипептида IL-2 и водорастворимого полимера (например, PEG) дополнительно связаны с антителом или его связывающими фрагментами. В некоторых случаях соотношение конъюгата IL-2 и антитела составляет приблизительно 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1 или 12:1. В некоторых случаях соотношение конъюгата IL-2 и антитела составляет приблизительно 1:1. В других случаях соотношение конъюгата IL-2 и антитела составляет приблизительно 2:1, 3:1 или 4:1. В дополнительных случаях соотношение конъюгата IL-2 и антитела составляет приблизительно 6:1 или выше.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько конъюгатов полипептида IL-2 и водорастворимого полимера (например, PEG) непосредственно связаны с антителом или его связывающими фрагментами. В других случаях конъюгат IL-2 опосредованно связан с антителом или его связывающими фрагментами посредством линкера. Иллюстративные линкеры включают гомобифункциональные линкеры, гетеробифункциональные линкеры, линкеры на основе малеимида, бесследные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры, спейсеры и т.п.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его связывающие фрагменты прямо или опосредованно связаны с частью полипептида IL-2 в конъюгате полипептида IL-2 и водорастворимого полимера (например, PEG). В таких случаях сайт конъюгации антитела с полипептидом IL-2 располагается в сайте, который не будет препятствовать связыванию полипептида IL-2 с IL-2R β . В дополнительных случаях сайт конъюгации антитела с полипептидом IL-2 располагается в участке, который частично блокирует связывание полипептида IL-2 с IL-2R β . В дополнительных случаях сайт конъюгации антитела с полипептидом IL-2 располагается в сайте, который будет препятствовать или еще больше препятствовать связыванию полипептида IL-2 с IL-2R α . В других вариантах осуществления антитело или его связывающие фрагменты прямо или опосредованно связаны с частью водорастворимого полимера в конъюгате полипептида IL-2 и водорастворимого полимера (например, PEG).

Пептиды.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгирующий фрагмент представляет собой пептид. В некоторых случаях пептид представляет собой неструктурированный пептид. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с пептидом. В некоторых случаях конъюгат IL-2, содержащий пептид, характеризуется увеличенным временем полужизни в сыворотке крови и/или повышенной стабильностью. В некоторых случаях конъюгат IL-2, содержащий пептид, характеризуется сниженным взаимодействием IL-2 с одной или несколькими субъединицами IL-2R. В дополнительных случаях пептид блокирует взаимодействие IL-2 с одной или несколькими субъединицами IL-2R.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент представляет собой пептид XTEN™ (Amunix Operating Inc.), а модификация называется XTETЧилированием. XTETЧилирование представляет собой ге-

нетическое слияние нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид, с нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид XTEN™ (Amunix Operating Inc.), длинный неструктурированный гидрофильный пептид, содержащий в разном процентном соотношении шесть аминокислот: Ala, Glu, Gly, Ser и Thr. В некоторых случаях пептид XTEN™ выбирают на основе таких свойств как экспрессия, генетическая стабильность, растворимость, устойчивость к агрегации, увеличенное время полужизни, повышенная эффективность и/или повышенная активность *in vitro* в комбинации с представляющим интерес полипептидом. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с пептидом XTEN. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с пептидом XTEN.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент представляет собой богатый глицином аминокислотный гомополимер (НАР), а модификация называется НАРилированием. НАРилирование представляет собой генетическое слияние нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид, с нуклеиновой кислотой, кодирующей богатый глицином аминокислотный гомополимер (НАР). В некоторых случаях полимер НАР содержит повторяющийся мотив $(Gly_4Ser)_n$ и иногда имеет длину, составляющую приблизительно 50, 100, 150, 200, 250, 300 или более остатков. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с НАР. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с НАР.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой полипептид PAS, и модификация называется PASизированием. PASизирование представляет собой генетическое слияние нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид, с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид PAS. Полипептид PAS представляет собой гидрофильный незаряженный полипептид, состоящий из остатков Pro, Ala и Ser. В некоторых случаях длина полипептида PAS составляет по меньшей мере приблизительно 100, 200, 300, 400, 500 или 600 аминокислот. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с полипептидом PAS. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с полипептидом PAS.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой эластин-подобный полипептид (ELP), и модификация называется ELРилированием. ELРилирование представляет собой генетическое слияние нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид, с нуклеиновой кислотой, кодирующей эластин-подобный полипептид (ELP). ELP содержит повторяющийся мотив VPGxG, в котором x представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина. В некоторых случаях полипептид цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) конъюгирован с ELP. В некоторых случаях полипептид IL-2 конъюгирован с ELP.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент представляет собой пептид СТР. Пептид СТР содержит пептид из 30 или 31 аминокислотного остатка (FQSSSS*KAPPPS*LSPSPS*RLPGPS*DTPILPQ (SEQ ID NO: 248) или FQDSSSS*KAPPPS*LSPSPS*RLPGPS*DTPILPQ (SEQ ID NO: 249)), в котором S* обозначает сайты O-гликозилирования (ОРКО). В некоторых случаях пептид СТР генетически слит с полипептидом цитокина (например, полипептидом IL-2). В некоторых случаях полипептид цитокина (например, полипептид IL-2) конъюгирован с пептидом СТР.

В некоторых вариантах осуществления цитокин (например, полипептид IL-2) модифицирован посредством глутамилирования. Глутамилирование (или полиглутамилирование) представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию глутамата, при которой γ -карбоксильная группа глутамата образует подобную пептидной связь с аминогруппой свободного глутамата, в котором α -карбоксильная группа переходит в полиглутаматную цепь.

В некоторых вариантах осуществления цитокин (например, полипептид IL-2) модифицирован с помощью полимера желатин-подобного белка (GLK). В некоторых случаях полимер GLK содержит несколько повторов Gly-Хаа-Уаа, где Хаа и Уаа преимущественно содержат пролин и 4-гидроксипролин соответственно. В некоторых случаях полимер GLK дополнительно содержит аминокислотные остатки Pro, Gly, Glu, Qln, Asn, Ser и Lys. В некоторых случаях длина полимера GLK составляет приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150 остатков или больше.

Дополнительные конъюгирующие фрагменты.

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит внеклеточный биомаркер. В некоторых случаях внеклеточный биомаркер представляет собой опухолевый антиген. В некоторых случаях иллюстративный внеклеточный биомаркер предусматривает CD19, PSMA, B7-H3, B7-H6, CD70, CEA, CSPG4, EGFRvIII, EphA3, EpCAM, EGFR, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, Lewis-Y, мезотелин, Muc1, Muc16, ROR1, TAG72, VEGFR2, CD11, Gr-1, CD204, CD16, CD49b, CD3, CD4, CD8 и B220. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент связан или конъюгирован с цитокином (например, IL-2). В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент является генетически слитым, например на N-конце или C-конце, с цитокином (например, IL-2).

В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит молекулу с посттрансляционной модификацией. В некоторых случаях примеры посттрансляционной модификации включают миристоилиро-

вание, пальмитоилирование, изопренилирование (или пренилирование) (например, фарнезилирование или геранилгеранилирование), глипирование, ацилирование (например, O-ацилирование, N-ацилирование, S-ацилирование), алкилирование (например, дополнительными алкильными группами, такими как металльные или этильные группы), амидирование, гликозилирование, гидроксильное, йодирование, добавление нуклеотидов, окисление, фосфорилирование, сукцинирование, сульфатирование, гликозилирование, карбамилирование, глутамилирование или дезамидирование. В некоторых случаях цитокин (например, IL-2) модифицирован посредством посттрансляционной модификации, такой как миристоилирование, пальмитоилирование, изопренилирование (или пренилирование) (например, фарнезилирование или геранилгеранилирование), глипирование, ацилирование (например, O-ацилирование, N-ацилирование, S-ацилирование), алкилирование (например, дополнительными алкильными группами, такими как металльные или этильные группы), амидирование, гликозилирование, гидроксильное, йодирование, добавление нуклеотидов, окисление, фосфорилирование, сукцинирование, сульфатирование, гликозилирование, карбамилирование, глутамилирование или дезамидирование.

Конъюгация.

Линкеры.

В некоторых вариантах осуществления применимые функциональные реакционноспособные группы для конъюгации или связывания конъюгирующего фрагмента с полипептидом цитокина (например, полипептидом IL-2), описанным в данном документе, включают, например, линкеры нулевого или более высокого порядка. В некоторых случаях неприродная аминокислота, встроенная в описанный в данном документе интерлейкин, содержит функциональную реакционноспособную группу. В некоторых случаях линкер содержит функциональную реакционноспособную группу, которая реагирует с неприродной аминокислотой, встроенной в описанный в данном документе интерлейкин. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит функциональную реакционноспособную группу, которая реагирует с неприродной аминокислотой, встроенной в описанный в данном документе интерлейкин. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит функциональную реакционноспособную группу, которая реагирует с линкером (необязательно предварительно присоединенным к пептиду цитокина), описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит реакционноспособную группу, которая вступает в реакцию с природной аминокислотой в пептиде цитокина, описанном в данном документе. В некоторых случаях линкеры более высокого порядка предусматривают бифункциональные линкеры, такие как гомобифункциональные линкеры или гетеробифункциональные линкеры. Иллюстративные гомобифункциональные линкеры включают без ограничения реагент Ломанта, представляющий собой дитиобис(сукцинимидилпропионат) DSP, 3'3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), этиленгликобис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), дисукцинимидилглутарат (DSG), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC), диметиладипимидат (DMA), диметилпимелимидат (DMP), диметилсуберимидат (DMS), диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат (DTBP), 1,4-ди-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)бутан (DPDPB), бисмалеимидогексан (BMH), арилгалогенид-содержащее соединение (DFDNB), такое как, например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол или 1,3-дифтор-4,6-динитробензол, 4,4'-дифтор-3,3'-динитрофенилсульфон (DFDNPS), бис-[β-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED), формальдегид, глутаральдегид, 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир, дигидразид адипиновой кислоты, карбогидразид, о-толуидин, 3,3'-диметилбензидин, бензидин, α,α'-п-диаминодифенил, дийод-п-ксилолсульфоновую кислоту, N,N'-этилен-бис(йодацетамид) или N,N'-гексаметилен-бис(йодацетамид).

В некоторых вариантах осуществления бифункциональный линкер предусматривает гетеробифункциональный линкер. Иллюстративный гетеробифункциональный линкер включает без ограничения аминокреактивные и сульфгидрильные кросс-линкеры, такие как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (sPDP), длинноцепочечный N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (LC-sPDP), водорастворимый длинноцепочечный N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (сульфо-LC-sPDP), сукцинимидилоксикарбонил-α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол (sMPT), сульфосукцинимидил-6-[α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-sMPT), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBs) сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-MBs), N-сукцинимидил(4-йодактеил)аминобензоат (sIAB), сульфосукцинимидил(4-йодактеил)аминобензоат (сульфо-sIAB), сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (sMPB), сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-sMPB), сложный эфир N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимид (GMBs), сложный эфир N-(γ-малеимидобутирилокси)сульфосукцинимид (сульфо-GMBs), сукцинимидил-6-((йодацетил)амино)гексаноат (sIAX), сукцинимидил-6-[6-((йодацетил)амино)гексаноил]амино]гексаноат (sIAXX), сукцинимидил-4-((йодацетил)амино)метил]циклогексан-1-карбоксилат (sIAC), сукцинимидил-

6-((((4-йодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбонил)амино)гексаноат (sIACX), п-нитрофенилйодацетат (NPIA), карбонил-реактивные и сульфгидрил-реактивные кросс-линкеры, такие как гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилгидразид-8 (M_2C_2H), 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид (PDPH), аминокреактивные и фотореактивные кросс-линкеры, такие как N-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота (NHs-AsA), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидосалициловая кислота (сульфо-NHs-AsA), сульфосукцинимидил-(4-азидосалициламидо)гексаноат (сульфо-NHs-LC-AsA), сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат (sAsD), N-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоат (HsAB), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат (сульфо-HsAB), N-сукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (sANPAH), сульфосукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (сульфо-sANPAH), N-5-азидо-2-нитробензоилоксисукцинимид (ANB-NOs), сульфосукцинимидил-2-(м-азидо-о-нитробензамидо)-этил-1,3'-дитиопропионат (sAND), N-сукцинимидил-4-(4-азидофенил)-1,3'-дитиопропионат (sADP), N-сульфосукцинимидил-4-(п-азидофенил)-1,3'-дитиопропионат (сульфо-sADP), сульфосукцинимидил-4-(п-азидофенил)бутират (сульфо-sAPB), сульфосукцинимидил-2-(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамид)этил-1,3'-дитиопропионат (sAED), сульфосукцинимидил-7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетат (сульфо-sAMCA), п-нитрофенилдиазопируват (ρ NPDP), п-нитрофенил-2-диазо-3,3,3-трифторпропионат (PNP-DTP), сульфгидрил-реактивные и фотореактивные кросс-линкеры, такие как 1-(п-азидосалициламидо)-4-(йодацетамидо)бутан (AsIB), N-[4-(п-азидосалициламидо)бутил]-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид (APDP), бензофенон-4-йодацетамид, бензофенон-4-малеимид, карбонил-реактивные и фотореактивные кросс-линкеры, такие как п-азидобензоилгидразид (ABH), карбоксилат-реактивные и фотореактивные кросс-линкеры, такие как 4-(п-азидосалициламидо)бутиламин (AsBA) и аргинин-реактивные и фотореактивные кросс-линкеры, такие как п-азидофенилглиоксаль (APG).

В некоторых случаях реакционноспособная функциональная группа предусматривает нуклеофильную группу, которая реагирует с электрофильной группой, присутствующей на связывающем фрагменте (например, на конъюгирующем фрагменте или на II-2). Иллюстративные электрофильные группы включают карбонильные группы, такие как альдегидная, кетонная, карбонильная группа карбоновой кислоты, сложного эфира, амида, енона, ацилгалогенида или ангидрида кислоты. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная функциональная группа представляет собой альдегидную группу. Иллюстративные нуклеофильные группы включают гидразидную, оксимную, amino, гидразинную, тиосемикарбазонную, гидразинкарбоксилатную и арилгидразидную. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота, встроенная в описанный в данном документе интерлейкин, содержит электрофильную группу.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой дипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления дипептидный линкер представляет собой валин-цитруллин (Val-Cit), фенилаланин-лизин (Phe-Lys), валин-аланин (Val-Ala) и валин-лизин (Val-Lys). В некоторых вариантах осуществления дипептидный линкер представляет собой валин-цитруллин.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислот. В некоторых случаях пептид линкер содержит не более 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или меньше аминокислот. В дополнительных случаях пептидный линкер содержит приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

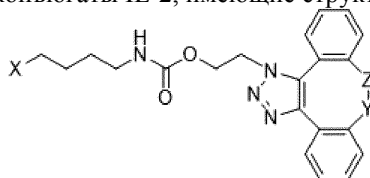
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит саморасщепляющийся линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся линкерный фрагмент включает п-аминобензиловый спирт (PAB), п-аминобензилоксикарбонил (PABC) или их производные или аналоги. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептидный линкерный фрагмент и саморасщепляющийся линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся линкерный фрагмент является таким, как описано в патенте США № 9089614 и заявке согласно WIPO № WO 2015038426.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой глюкуроноид. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой расщепляемый кислотой линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый кислотой линкер представляет собой гидразин. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой восстанавливаемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит малеимидную группу. В некоторых случаях малеимидную группу также называют малеимидным спейсером. В некоторых случаях малеимидная группа дополнительно содержит капроновую кислоту, образующую малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер содержит малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер представляет собой малеимидокапроил (mc). В других случаях малеимидная группа включает малеимидометильную группу, такую как сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC) или сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC), описанные выше.

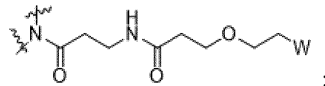
В некоторых вариантах осуществления maleimidная группа представляет собой самостабилизирующийся maleимид. В некоторых случаях самостабилизирующийся maleимид задействует диаминопропионовую кислоту (DPR) для включения основной аминокислоты, смежной с maleимидом, для обеспечения внутримолекулярного катализа гидролиза тиосукцинимидного кольца с исключением тем самым участия maleимида в реакции элиминирования посредством обратной реакции Михаэля. В некоторых случаях самостабилизирующийся maleимид представляет собой maleимидную группу, описанную в Lyon, et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat. Biotechnol. 32(10):1059-1062 (2014). В некоторых случаях линкер содержит самостабилизирующийся maleимид. В некоторых случаях линкер представляет собой самостабилизирующийся maleимид.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, имеющие структуру формулы (I),



формула (I);

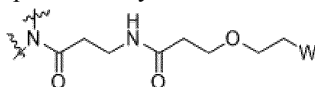
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой ; или



Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой

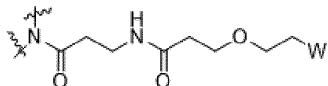
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа и 50 кДа; и

X представляет собой положение аминокислоты рекомбинантного человеческого IL-2, где положение аминокислоты относится к положениям в SEQ ID NO: 1; или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) Z представляет



собой CH₂, и Y представляет собой

В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) Y представляет собой CH₂, и Z

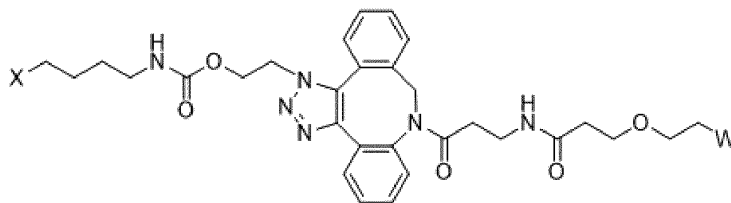


представляет собой

В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа, 30 кДа, 40 кДа, 45 кДа, 50 кДа, 55 кДа и 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 5 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 10 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 30 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 55 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой K9. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой H16. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой L19. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой D20. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой M23. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой N26. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой T41. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой N88. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой E100. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой N119. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой T123. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой Q126. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (I) X представляет собой S127. В некоторых вариантах

конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 239. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 240. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 241. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 242. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 243. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 244. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (I) содержит последовательность под SEQ ID NO: 245.

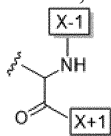
В данном документе описаны конъюгаты IL-2, имеющие структуру формулы (II),



формула (II);

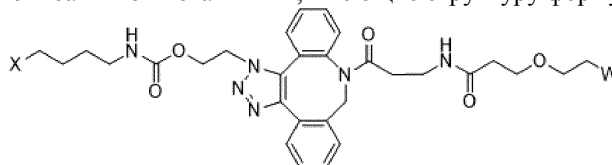
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа и 50 кДа; и

X представляет собой положение аминокислоты, характеризующееся структурой



рекомбинантного человеческого IL-2, выбранное из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, E100, N119, T123, Q126, S127, T131, D109 и V91, где положение аминокислоты соответствует положениям в SEQ ID NO: 1.

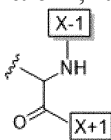
В данном документе описаны конъюгаты IL-2, имеющие структуру формулы (III),



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа и 50 кДа; и

X представляет собой положение аминокислоты, характеризующееся структурой

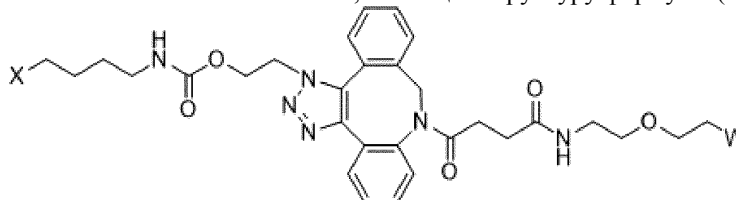


рекомбинантного человеческого IL-2, выбранное из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, E100, N119, T123, Q126, S127, T131, D109 и V91, где положение аминокислоты соответствует положениям в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) X представляет собой положение K9 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа, и X представляет собой положение K9 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) X представляет собой положение H16 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа, и X представляет собой положение H16 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) X представляет собой положение L19 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа, и X представляет собой положение L19 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) X представляет собой положение D20 рекомбинантного человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгата IL-2 формулы (II) или формулы (III) группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа, и X представляет собой положение D20 рекомбинантного человеческого IL-2.

228. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 229. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 230. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 231. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 232. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 233. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 234. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 235. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 236. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 237. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 238. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 239. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 240. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 241. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 242. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 243. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 244. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 формулы (II) или формулы (III) содержит последовательность под SEQ ID NO: 245.

В данном документе описаны фармацевтические композиции формулы (I), формулы (II) или формулы (III). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (II) или формулы (III) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3-29 и 70-84. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (II) или формулы (III) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (II) или формулы (III) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 4.

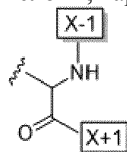
В данном документе описаны конъюгаты IL-2, имеющие структуру формулы (IV),



формула (IV);

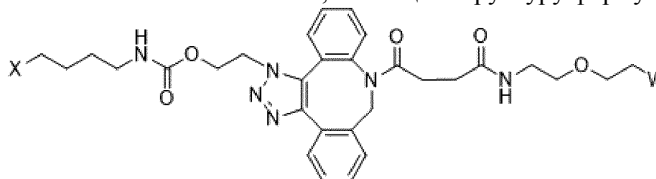
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа и 30 кДа; и

X представляет собой положение аминокислоты, характеризующееся структурой



рекомбинантного человеческого IL-2, выбранное из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, E100, N119, T123, Q126, S127, T131, D109 и V91, где положение аминокислоты соответствует положениям в SEQ ID NO: 1.

В данном документе описаны конъюгаты IL-2, имеющие структуру формулы (V),



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа и 30 кДа; и

которых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (X) или формулы (XI) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3, 4 и 5-244. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (X) или формулы (XI) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3. В данном документе описаны фармацевтические композиции формулы (XII), формулы (XIII) или формулы (V). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (XII) или формулы (XIII) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3, 4 и 5-244. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции формулы (I), формулы (XII) или формулы (XIII) содержат последовательность, предусматривающую любую из SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию циклоприсоединения с обращенными электронными требованиями, включающую диен и диенофил. В некоторых вариантах осуществления диен включает тетразин. В некоторых вариантах осуществления диенофил включает алкен. В некоторых вариантах осуществления диенофил включает алкин. В некоторых вариантах осуществления алкен представляет собой напряженный алкин. В некоторых вариантах осуществления алкен представляет собой транс-циклооктин. В некоторых вариантах осуществления алкин представляет собой циклооктен. В некоторых вариантах осуществления алкен представляет собой циклопропен. В некоторых вариантах осуществления алкен представляет собой фторциклопропен. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации приводит к образованию пептида цитокина, присоединенного к линкеру или конъюгирующему фрагменту посредством 6-членного кольцевого гетероцикла, содержащего два атома азота в кольце.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию метатезиса олефинов. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию алкена и алкина с рутениевым катализатором. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию двух алкенов с рутениевым катализатором. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию двух алкинов с рутениевым катализатором. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию алкена или алкина с рутениевым катализатором и аминокислотой, содержащей аллилную группу. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию алкена или алкина с рутениевым катализатором и аминокислотой, содержащей аллилсульфид или селенид. В некоторых вариантах осуществления рутениевый катализатор представляет собой катализатор Ховейды-Граббса 2-го поколения. В некоторых вариантах осуществления реакция метатезиса олефинов включает реакцию одного или нескольких напряженных алкенов или алкинов.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию кросс-сочетания. В некоторых вариантах осуществления реакции кросс-сочетания включают катализаторы на основе переходных металлов, таких как иридий, золото, рутений, родий, палладий, никель, платина, или катализатор на основе другого переходного металла, и один или несколько лигандов. В некоторых вариантах осуществления катализаторы на основе переходных металлов являются водорастворимыми. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию кросс-сочетания Сузуки-Мияуры. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию арилгалогенида (или трифлата, или тозилата), арил- или алкенилбороновой кислоты и палладиевого катализатора. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию кросс-сочетания Соногаширы. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию арилгалогенида (или трифлата, или тозилата), алкина и палладиевого катализатора. В некоторых вариантах осуществления реакции перекрестного сочетания приводят к присоединению линкера или конъюгирующего фрагмента к пептиду цитокина посредством углерод-углеродной связи.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию снятия защиты или "освобождения" реакционноспособной группы перед конъюгацией. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает освобождение реакционноспособной группы с помощью света с последующей реакцией конъюгации. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена аралкильным фрагментом, содержащим одну или несколько нитрогрупп. В некоторых вариантах осуществления освобождение реакционноспособной группы приводит к образованию свободного амина, сульфида или другой реакционноспособной группы. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает освобождение реакционноспособной группы с помощью катализатора на основе переходного металла с последующей реакцией конъюгации. В некоторых вариантах осуществления катализатор на основе переходного металла содержит палладий и один или не-

сколько лигандов. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена аллильным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена аллильным карбаматом. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена пропаргильным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена пропаргилкарбаматом. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа защищена диенофилом, где воздействие диена (такого как тетразин) приводит к снятию защиты с реакционноспособной группы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает лиганд-направленную реакцию, где лиганд (необязательно), присоединенный к реакционноспособной группе), обеспечивает сайт конъюгации между реакционноспособной группой и пептидом цитокина. В некоторых вариантах осуществления лиганд отщепляется в ходе или после реакции пептида цитокина с реакционноспособной группой. В некоторых вариантах осуществления сайт конъюгации пептида цитокина представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления сайт конъюгации пептида цитокина представляет собой лизин, цистеин или серин. В некоторых вариантах осуществления сайт конъюгации пептида цитокина представляет собой неприродную аминокислоту, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа включает уходящую группу, такую как бедная электронами арильная или гетероарильная группа. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа предусматривает уходящую группу, такую как бедная электронами алкильная группа, которая замещается пептидом цитокина. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию улавливающего радикалы средства с химическим радикалом. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию присоединения окислительного радикала. В некоторых вариантах осуществления улавливающее радикалы средство представляет собой ариламин. В некоторых вариантах осуществления химический радикал представляет собой тирозильный радикал. В некоторых вариантах осуществления химические радикалы генерируются рутениевым катализатором (таким как $[Ru(bpy)_3]$) и светом.

Ферментативные реакции необязательно применяются для описанных в данном документе реакций конъюгации. Примеры ферментативных конъюгаций включают конъюгацию, опосредованную SortA, конъюгацию, опосредованную TG, или конъюгацию, опосредованную FGE. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает лигирование нативного белка (NPL) по концевой 1-амино-2-тиогруппе с тиоэфиром с образованием амидной связи.

В данном документе описаны различные реакции конъюгации для осуществления реакции линкера или конъюгирующего фрагмента с пептидом цитокина, где реакция происходит с природной ("канонической") аминокислотой в пептиде цитокина. В некоторых вариантах осуществления природная аминокислота обнаруживается в положении конъюгации, находящемся в последовательности дикого типа, или, в качестве альтернативы, положение было мутировано. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации предусматривает образование дисульфидной связи в остатке цистеина. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации включает реакцию Михаэля 1,4-присоединения цистеина или лизина. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации предусматривает лигирование цианобензотиазола с цистеином. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации включает сшивание с ацетоновым фрагментом, таким как 1,3-дихлор-2-пропион. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации включает 1,4-присоединение по Михаэлю к дегидроаланину, образованному в реакции цистеина с О-мезитилсульфонилгидроксиламином. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации включает реакцию тирозина с триазолиндионом (TAD) или производным TAD. В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации включает реакцию триптофана с карбеноидом родия.

Способы применения.

Аутоиммунное заболевание или нарушение.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе также описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина (например, конъюгата IL-2), описанного в данном документе. В некоторых случаях конъюгат IL-2 содержит выделенный и очищенный полипептид IL-2 и конъюгирующий фрагмент, где конъюгат IL-2 характеризуется сниженной аффинностью в отношении субъединицы рецептора IL-2 β (IL-2R β), субъединицы рецептора IL-2 γ (IL-2R γ) или их комбинации по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых случаях конъюгат IL-2 содержит выделенный и очищенный полипептид IL-2 и конъюгирующий фрагмент, который связывается с выделенным и очищенным полипептидом IL-2 в остатке аминокислоты, выбранном из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых

случаях аминокислотный остаток выбран из K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133. В некоторых случаях аминокислотный остаток выбран из K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 и Q126. В некоторых случаях аминокислотный остаток выбран из K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, R80, D83, S86, N87, V90, I91, L93, E94, E115, N118, R119, T122, A124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132. В некоторых случаях аминокислотный остаток выбран из K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 и Q126, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях конъюгат IL-2 взаимодействует с комплексом IL-2R $\alpha\beta\gamma$, но со сниженной аффинностью в отношении субъединиц IL-2R β и IL-2R γ , или он будет уменьшать рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β . В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2 сохраняет аффинность связывания в отношении IL-2R α по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В таких случаях комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ стимулирует или усиливает размножение CD4⁺ Treg-клеток. В дополнительных случаях модифицированный полипептид IL-2 обеспечивает повышение дозы, требующейся для активации T_H17- и/или NK-клеток посредством комплекса IL-2R $\alpha\beta\gamma$, с расширением тем самым диапазонов дозы для активации Treg-клеток посредством комплекса IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (или с расширением терапевтического окна IL-2 для активации Treg-клеток посредством комплекса IL-2R $\alpha\beta\gamma$). В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина (например, конъюгата IL-2), описанного в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 199-213. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 49-63. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 213-228. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 64-78. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 229-243. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 154-168. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 109-123. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 169-183. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 123-138. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 184-198. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина формулы (I), содержащего любую из SEQ ID NO: 139-153.

В некоторых случаях аутоиммунное заболевание или нарушение включает очаговую алопецию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, дерматомиозит, диабет 1 типа, ювенильный идиопатический артрит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, миастению гравис, рассеянный склероз, пемфигус/пемфигоид,

пернициозную анемию, узелковый полиартериит, полимиозит, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродермию, синдром Шегрена, системную красную волчанку, тиреоидит, увеит, витилиго или гранулематоз Вегенера.

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, интерлейкина, IFN или TNF) вводят субъекту, у которого имеется очаговая алопеция, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, дерматомиозит, диабет 1 типа, ювенильный идиопатический артрит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, миастения гравис, рассеянный склероз, пемфигус/пемфигоид, пернициозная анемия, узелковый полиартериит, полимиозит, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, системная красная волчанка, тиреоидит, увеит, витилиго или гранулематоз Вегенера.

В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется очаговая алопеция, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, дерматомиозит, диабет 1 типа, ювенильный идиопатический артрит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, миастения гравис, рассеянный склероз, пемфигус/пемфигоид, пернициозная анемия, узелковый полиартериит, полимиозит, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, системная красная волчанка, тиреоидит, увеит, витилиго или гранулематоз Вегенера. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется диабет 1 типа. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется болезнь Грейвса. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется рассеянный склероз. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется псориаз. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется ревматоидный артрит. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется синдром Шегрена. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется системная красная волчанка. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется увеит. В некоторых случаях конъюгат IL-2 вводят субъекту, у которого имеется гранулематоз Вегенера.

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят субъекту для лечения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) по настоящему изобретению вводят субъекту для лечения отторжения трансплантата.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) по настоящему изобретению вводят субъекту для лечения контактной чувствительности.

Гиперчувствительность замедленного типа (DTH), также называемая гиперчувствительностью IV типа, представляет собой воспалительную реакцию, опосредованную антиген-специфическими эффекторными Т-лимфоцитами.

Воспалительная реакция характеризуется местным отеком кожи, эритемой, уплотнением и клеточной инфильтрацией. DTH можно активно индуцировать путем иммунизации антигенами, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), гемоцианин фисуреллы (KLH) или овальбумин (OVA). Адаптивный перенос антиген-специфических Т-лимфоцитов также можно использовать для индукции ответа DTH. DTH обеспечивает способ оценки эффекта соединений на животной модели хронического иммунного ответа и/или хронического воспаления. DTH также можно использовать для измерения действия средства на подавление острого ответа субъекта на антиген. Развитие ответа DTH состоит из двух отдельных фаз: начальной фазы сенсibilизации и фазы выявления. Начальная фаза сенсibilизации имеет место, когда субъекты подвергаются воздействию определенного антигена. Последняя фаза может быть инициирована, например, через 5-12 дней после сенсibilизации, при этом предварительно сенсibilизированных субъектов подвергают воздействию, например, подкожной инъекции в подушечки стопы или внутрикожной инъекции в ухо одного и того же антигена.

Конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2), описанный в данном документе, можно вводить субъекту с аутоиммунным заболеванием, моделируемым, представленным и/или характеризующимся реакцией DTH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ облегчения или устранения аутоиммунного состояния, смоделированного, представленного и/или характеризующегося реакцией DTH у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина (например, конъюгата IL-2), описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ облегчения или устранения DTH у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата цитокина (например, конъюгата IL-2), описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту, нуждающемуся в этом, вводят терапевтически эффективное количество конъюгата цитокина (например, конъюгата IL-2) для предупреждения или уменьшения развития реакции DTH или для предупреждения или уменьшения развития состояния (и/или симптомов состояния), смоделированного, представленного и/или характеризующегося реакцией DTH.

В некоторых вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят дополнительное терапевтическое средство. В некоторых случаях дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно с

конъюгатом цитокина (например, конъюгатом IL-2). В других случаях дополнительное терапевтическое средство и конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят последовательно, например, конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят перед дополнительным терапевтическим средством или конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят после введения дополнительного терапевтического средства.

Иллюстративные дополнительные терапевтические средства для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включают без ограничения кортикостероиды, такие как преднизон, будесонид или преднизолон; ингибиторы кальциневрина, такие как циклоспорин или такролимус; ингибиторы mTOR, такие как сиролimus или эверолимус; ингибиторы IMDH, такие как азатиоприн, лефлуномид или микофенолат; биологические средства, такие как абацепт, адалимумаб, анакинра, цертолизумаб, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб, иксекизумаб, натализумаб, ритуксимаб, секукинумаб, тоцилизумаб, устекинумаб или ведолизумаб; а также моноклональные антитела, такие как базиликсимаб, даклизумаб или муromонаб.

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с дополнительным терапевтическим средством, выбранным из кортикостероида, такого как преднизон, будесонид или преднизолон; ингибитора кальциневрина, такого как циклоспорин или такролимус; ингибитора mTOR, такого как сиролimus или эверолимус; ингибитора IMDH, такого как азатиоприн, лефлуномид или микофенолат; биологического средства, такого как абацепт, адалимумаб, анакинра, цертолизумаб, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб, иксекизумаб, натализумаб, ритуксимаб, секукинумаб, тоцилизумаб, устекинумаб или ведолизумаб; а также моноклонального антитела, такого как базиликсимаб, даклизумаб или муromонаб.

Дополнительные терапевтические средства.

В некоторых вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят дополнительное терапевтическое средство. В некоторых случаях дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно с конъюгатом цитокина (например, конъюгатом IL-2). В других случаях дополнительное терапевтическое средство и конъюгат IL-2 вводят последовательно, например, конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят перед дополнительным терапевтическим средством или конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят после введения дополнительного терапевтического средства.

В некоторых случаях дополнительное терапевтическое средство включает химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство, средство для таргетной терапии, лучевую терапию или их комбинацию. Иллюстративные дополнительные терапевтические средства включают без ограничения NSAIDS ((1) производные салициловой кислоты: ацетилсалициловую кислоту (аспирин), дифлунисал и сульфасалазин; (2) производные пара-аминофенола: ацетаминофен; (3) фенаматы: мефенаминовую кислоту, меклофенамат, флуфенаминовую кислоту; (4) производные пропионовой кислоты: ибупрофен, напроксен, фенопрофен, кетопрофен, флурбипрофен, оксапрозин; и (5) производные еноловой кислоты (оксикам): пироксикам, теноксикам); ингибиторы COX-2 (целекоксиб, рофекоксиб, валдекоксиб, лумиракоксиб, парекоксиб и эторикоксиб); глюкокортикоиды преднизон/преднизолон, метилпреднизолон и фторированные глюкокортикоиды, такие как дексаметазон и бетаметазон), sDMARD (традиционные модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства: метотрексат, лефлуномид; соединения золота, сульфасалазин, азатиоприн, циклофосфамид, противомаларийные препараты, d-пеницилламин, циклоспорин); антитела к TNF (инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб пегол).

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с дополнительным терапевтическим средством, выбранным из кортикостероида, такого как преднизолон, метилпреднизолон или дексаметазон.

В некоторых случаях описанный в данном документе конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с ингибитором контрольных точек иммунного ответа. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают

ингибиторы PD-L1, такие как MPDL3280A (RG7446) от Genentech, мышинное антитело к PD-L1, клон 10F.9G2 (номер по каталогу BE0101) от BioXcell, моноклональное антитело к PD-L1 MDX-1105 (BMS-936559) и BMS-935559 от Bristol-Myer's Squibb, MSB0010718C, мышинное антитело к PD-L1, клон 29E.2A3, MEDI4736 от AstraZeneca, атезолизумаб (также известный как Tecentriq®), бавелизумаб (также известный как Imfinzi®) и авелумаб (также известный как Bavencio®);

ингибиторы PD-L2, такие как AMP-224 (амплимун) от GlaxoSmithKline и rHlgM12B7;

ингибиторы PD-1, такие как мышинное антитело к PD-1, клон J43, (номер по каталогу BE0033-2) от BioXcell, мышинное антитело к PD-1, клон RMP1-14, (номер по каталогу BE0146) от BioXcell, мышинное антитело к PD-1, клон EH12, мышинное антитело к PD-1, МК-3475 (Keytruda, пембролизумаб, ламбролизумаб) от Merck, антитело к PD-1 от AnaptysBio, известное как ANB011, антитело MDX-1 106 (ONO-4538), моноклональное антитело ниволумаб на основе человеческого IgG4 (Opdivo®, BMS-936558, MDX1106) от Bristol-Myers Squibb, AMP-514 и AMP-224 от AstraZeneca и пидилизумаб (CT-011) от CureTech Ltd;

ингибиторы CTLA-4, такие как антитело ипилимумаб к CTLA-4 (также известное как Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 и MDX-101) от Bristol Myers Squibb, антитело к CTLA4, клон 9H10, от Millipore, тремелимуаб (CP-675,206, тицилимумаб) от Pfizer и антитело к CTLA4, клон BNI3, от Abcam;

ингибиторы LAG3, такие как антитело к Lag-3, клон eBioC9B7W, (C9B7W) от eBioscience, антитело LS-B2237 к Lag3 от LifeSpan Biosciences, IMP321 (ImmuFact) от Immunet, антитело к Lag3 BMS-986016 и химерное антитело к LAG-3 A9H12;

ингибиторы B7-H3, такие как MGA271;

ингибиторы KIR, такие как лирилумаб (IPH2101);

ингибиторы CD137, такие как урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (к 4-1BB, PF-2566, Pfizer) или XmAb-5592 (Xencor);

ингибиторы PS, такие как бавитуксимаб;

а также ингибиторы, такие как антитело или его фрагменты (например, моноклональное антитело, человеческое, гуманизованное или химерное антитело), молекулы для RNAi или небольшие молекулы к TIM3, CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, OX40, ICOS, BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGIT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 или SLAM.

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят в комбинации с пембролизумабом, ниволумабом, тремелимуабом или ипилимумабом.

В некоторых случаях описанный в данном документе конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с антителом, таким как алемтузумаб, трастузумаб, ибритумомаб тиуксетан, брентуксимаб ведотин, адо-трастузумаб эмтанзин или блинатумомаб.

В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с дополнительным терапевтическим средством, выбранным из агониста рецептора. В некоторых случаях агонист рецептора включает лиганд Toll-подобного рецептора (TLR).

В некоторых случаях лиганд TLR включает TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9. В некоторых случаях лиганд TLR включает синтетический лиганд, такой как, например, Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPС, поли I:C, поли A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA или флагеллин. В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с одним или несколькими агонистами TLR, выбранными из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 и TLR9. В некоторых случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят с одним или несколькими агонистами TLR, выбранными из Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPС, поли I:C, поли A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA и флагеллина.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) используют для *ex vivo* активации и/или размножения аутологичных и/или аллогенных Т-клеток при переносе. В таких случаях конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) используют для активации и/или размножения образца, содержащего аутологичные и/или аллогенные Т-клетки, и конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) необязательно удаляют из образца до введения образца нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитокина (например, конъюгат IL-2) вводят в комбинации с хирургическим вмешательством.

Разработка средств для адоптивной клеточной терапии.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются способы получения композиции для адоптивной клеточной терапии, применимой для лечения заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе (например, пролиферативного заболевания или патологического состояния, патогенной инфекции и/или аутоиммунного заболевания или состояния), у нуждающегося в этом субъекта, включающие а) обеспечение иммунных клеток, получаемых от нуждающегося в этом субъекта; б) приведение иммунных клеток в контакт с модифицированным полипептидом IL-2, конъюгатом IL-2, белком, связывающим IL-2Rβγ, или активатором иммунной клетки, где иммунная клетка включает CD4+ хелперную клетку, CD8+ эффекторную наивную и клетку памяти, CD8+ цитотоксическую Т-клетку, супрессорную Т-клетку, натуральную киллерную (NK) клетку или натуральную киллерную Т-клетку (NKT). В некоторых вариантах осуществления иммунную клетку конструируют для дополнительной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых случаях модифицированный полипептид IL-2, конъюгат IL-2, белок, связывающий IL-2Rβγ, или активатор иммунной клетки содержит изделия, раскрываемые в данном документе. В некоторых случаях способы получения средства для адоптивной клеточной терапии клеток осуществляют с использованием наборов, раскрываемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергают лечению с помощью средства для адоптивной клеточной терапии путем введения терапевтически эффективного количества средства для адоптивной клеточной терапии. В некоторых случаях у субъекта диагностировано заболевание или патологическое состояние. В некоторых случаях средство для адоптивной клеточной терапии является эффективным для лечения заболевания или патологического состояния у субъекта. В некоторых случаях заболевание или состояние предусматривает аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 представляет собой конъюгат с любой из SEQ ID NO: 5-244.

В некоторых случаях молекулярная масса PEG является эффективной для улучшения процесса из-

готовления полипептида IL-2 или конъюгата IL-2 в качестве реагента для средств, предназначенных для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG улучшает растворимость полипептида IL-2 или конъюгата IL-2. В некоторых случаях молекулярная масса PEG улучшает процесс очистки при изготовлении средства для адоптивной клеточной терапии. В некоторых случаях молекулярная масса PEG улучшает стабильность полипептида IL-2 или конъюгата IL-2.

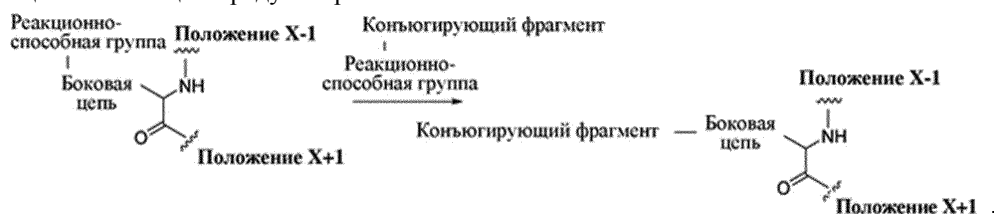
В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются способы лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, которые включают введение субъекту средства для адоптивной клеточной терапии, описанного в данном документе. В некоторых случаях средство для адоптивной клеточной терапии разрабатывают с использованием способов, описанных в данном документе. В некоторых случаях средство для адоптивной клеточной терапии вводят субъекту в дополнение к конъюгату цитокина (например, конъюгату IL-2), описанному в данном документе. В некоторых случаях конъюгат цитокина вводят перед средством для адоптивной клеточной терапии. В некоторых случаях конъюгат цитокина вводят после средства для адоптивной клеточной терапии. В некоторых случаях средство для адоптивной клеточной терапии является эффективным для обеспечения размножения популяции иммунных клеток у субъекта (например, популяций CD4+ хелперных клеток, CD8+ эффекторных наивных и клеток памяти, NK-клеток и/или NKT-клеток, популяции Treg-клеток).

Химия конъюгации.

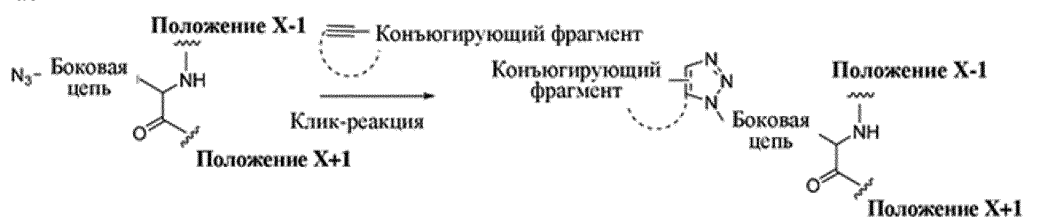
Различные реакции конъюгации применяют для конъюгации линкеров, конъюгирующих фрагментов и неприродных аминокислот, встроенных в пептиды цитокина, описанные в данном документе. Такие реакции конъюгации часто совместимы с водными условиями, такие как "биоортогональные" реакции. В некоторых вариантах осуществления реакции конъюгации опосредуются химическими реагентами, такими как катализаторы, свет или реакционноспособные химические группы, обнаруженные на линкерах, конъюгирующих фрагментах или в неприродных аминокислотах. В некоторых вариантах осуществления реакции конъюгации опосредуются ферментами. В некоторых вариантах осуществления применяемая в данном документе реакция конъюгации описана в Gong, Y., Pan, L. *Tett. Lett.* 2015, 56, 2123. В некоторых вариантах осуществления применяемая в данном документе реакция конъюгации описана в Chen, X.; Wu, Y.-W. *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14, 5417.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения. В некоторых вариантах осуществления реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения включает реакцию азида и фосфина ("клик"-реакцию). В некоторых вариантах осуществления реакция конъюгации катализируется медью. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации приводит к получению пептида цитокина, содержащего линкер или конъюгирующий фрагмент, присоединенный посредством триазола. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию азида с напряженным олефином. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации включает реакцию азида с напряженным алкином. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает реакцию азида с циклоалкином, например DBCO.

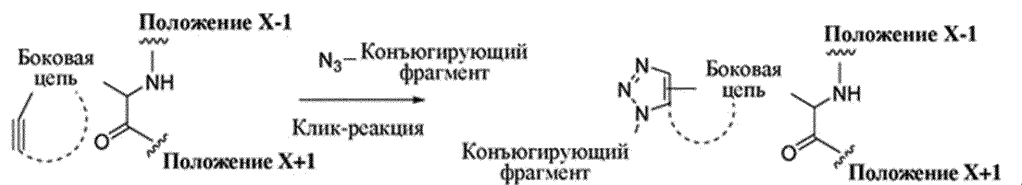
В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает



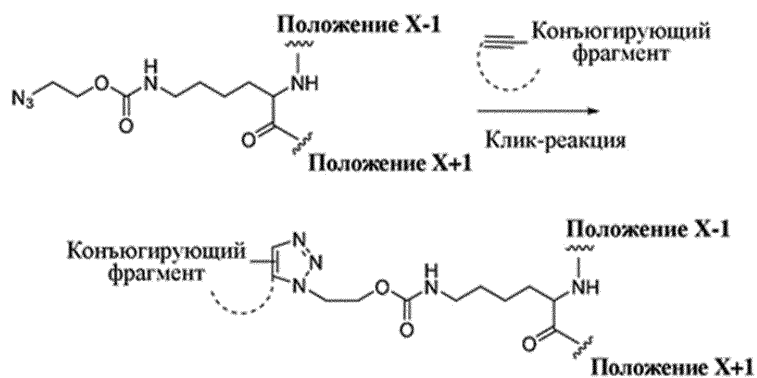
где X представляет собой положение в конъюгате IL-2, содержащем неприродную аминокислоту, такую как в любой из последовательности под SEQ ID NO: 5-19 и 79-93. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент содержит водорастворимый полимер. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа предусматривает алкин или азид. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает



где X представляет собой положение в конъюгате IL-2, содержащем неприродную аминокислоту, такую как в любой из последовательности под SEQ ID NO: 5-19 и 79-93. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает

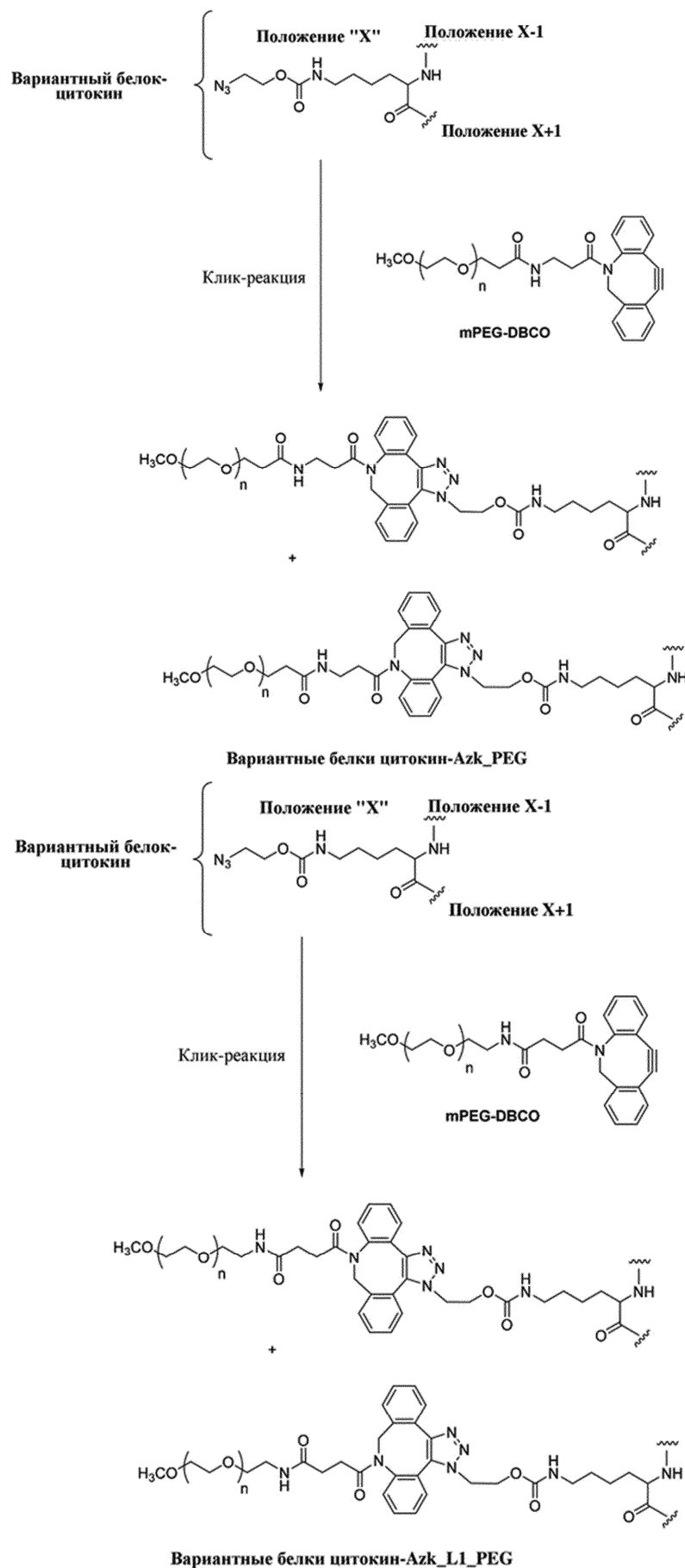


где X представляет собой положение в конъюгате IL-2, содержащем неприродную аминокислоту, такую как в любой из последовательности под SEQ ID NO: 5-19 и 79-93. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанная в данном документе реакция конъюгации предусматривает



где X представляет собой положение в конъюгате IL-2, содержащем неприродную аминокислоту, такую как в любой из последовательности под SEQ ID NO: 5-19 и 79-93.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, реакция конъюгации, описанная в данном документе, предусматривает реакцию циклоприсоединения между азидным фрагментом, таким как фрагмент, содержащийся в белке, содержащем аминокислотный остаток, полученный из N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизина (AzK), и напряженным циклоалкином, таким как полученный из DBCO, который представляет собой химический фрагмент, содержащий группу дибензоциклооктина. Группы PEG, содержащие фрагмент DBCO, являются коммерчески доступными или могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники.



С помощью реакций конъюгации, таких как клик-реакция, описанных в данном документе, можно создавать один региоизомер или смесь региоизомеров. В некоторых случаях соотношение региоизомеров

составляет приблизительно 1:1. В некоторых случаях соотношение региоизомеров составляет приблизительно 2:1. В некоторых случаях соотношение региоизомеров составляет приблизительно 1,5:1. В некоторых случаях соотношение региоизомеров составляет приблизительно 1,2:1. В некоторых случаях соотношение региоизомеров составляет приблизительно 1,1:1. В некоторых случаях соотношение региоизомеров составляет более чем 1:1.

Получение полипептида цитокина.

В некоторых случаях конъюгаты IL-2, описанные в данном документе, содержащие либо мутацию с заменой на природную аминокислоту, либо мутацию с заменой на неприродную аминокислоту, получают рекомбинантным путем или синтезируют химическим путем. В некоторых случаях конъюгаты IL-2, описанные в данном документе, получают рекомбинантным путем, например, либо в системе клеток-хозяев, либо в бесклеточной системе.

В некоторых случаях конъюгаты IL-2 получают рекомбинантным путем с применением системы клеток-хозяев. В некоторых случаях клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку (например, клетку млекопитающего, клетки насекомых, дрожжевые клетки или растительную клетку), прокариотическую клетку (например, грамположительную бактерию или грамотрицательную бактерию). В некоторых случаях эукариотическая клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина млекопитающего. В некоторых случаях клетка-хозяин млекопитающего является стабильной линией клеток или линией клеток, которая содержит встроенный представляющий интерес генетический материал в свой собственный геном и обладает способностью экспрессировать продукт генетического материала после многих поколений клеточного деления. В других случаях клетка-хозяин млекопитающего представляет собой транзистентную линию клеток или линию клеток, которая не содержит встроенный представляющий интерес генетический материал в свой собственный геном и не обладает способностью экспрессировать продукт генетического материала после многих поколений клеточного деления.

Иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих включают линию клеток 293T, линию клеток 293A, линию клеток 293FT, клетки 293F, клетки 293 H, клетки A549, клетки MDCK, клетки CHO DG44, клетки CHO-S, клетки CHO-K1, клетки Expi293TM, линию клеток Flp-InTM T-RExTM 293, линию клеток Flp-InTM-293, линию клеток Flp-InTM-3T3, линию клеток Flp-InTM-BHK, линию клеток Flp-InTM-CHO, линию клеток Flp-InTM-CV-1, линию клеток Flp-InTM-Jurkat, клетки FreeStyleTM 293-F, клетки FreeStyleTM CHO-S, линию клеток GripTiteTM 293 MSR, линию клеток GS-CHO, клетки HepaRGTM, линию клеток T-RExTM Jurkat, клетки Per.C6, линию клеток T-RExTM-293, линию клеток T-RExTM-CHO и линию клеток T-RExTM-HeLa.

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, являющуюся клеткой насекомого. Иллюстративная клетка-хозяин насекомого включает клетки S2 Drosophila, клетки Sf9, клетки Sf21, клетки High FiveTM и клетки expresSF+[®].

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку-хозяина. Иллюстративные дрожжевые клетки-хозяева включают такие штаммы дрожжей *Pichia pastoris*, как GS115, KM71H, SMD1168, SMD1168H и X-33, и такой штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, как INVSc1.

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка-хозяин представляет собой растительную клетку-хозяина. В некоторых случаях растительные клетки включают клетку водоросли. Иллюстративные линии растительных клеток включают штаммы из *Chlamydomonas reinhardtii* 137c или *Synchococcus elongatus* PPC 7942.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку-хозяина. Иллюстративные прокариотические клетки-хозяева включают BL21, Mach1TM, DH10BTM, TOP10, DH5 α , DH10BacTM, OmniMaxTM, MegaXTM, DH12STM, INV110, TOP10F', INV α F, TOP10/P3, ccdB Survival, PIR1, PIR2, Stb12TM, Stb13TM или Stb14TM.

В некоторых случаях подходящие молекулы полинуклеиновой кислоты или векторы для получения полипептида IL-2, описанного в данном документе, включают любые подходящие векторы, полученные из либо эукариотического, либо прокариотического источника. Иллюстративные молекулы полинуклеиновой кислоты или векторы включают векторы из бактерий (например, *E. coli*), насекомых, дрожжей (например, *Pichia pastoris*), водорослей или источника, представляющего собой млекопитающее. Бактериальные векторы включают, например, pACYC177, pASK75, ряд векторов pBAD, ряд векторов pBADM, ряд векторов pET, ряд векторов pETM, ряд векторов pGEX, pHAT, pHAT2, pMal-c2, pMal-p2, ряд векторов pQE, pRSET A, pRSET B, pRSET C, ряд pTrcHis2, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12c, pTAC-MAT-1, pFLAG CTC или pTAC-MAT-2.

Векторы насекомых включают, например, pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBact M30b, pFastBac, M30c, pVL1392, pVL1393, pVL1393 M10, pVL1393 M11, pVL1393 M12, такие векторы FLAG, как pPolh-FLAG1 или pPolh-MAT 2, или такие векторы MAT, как pPolh-MAT1 или pPolh-MAT2.

Дрожжевые векторы включают, например, вектор Gateway[®] pDEST 14, вектор Gateway[®] pDESTTM 15, вектор Gateway[®] pDESTTM 17, вектор Gateway[®] pDESTTM 24, вектор Gateway[®] pYES-DEST52, век-

тор доставки pBAD-DEST49 Gateway®, вектор pAO815 Pichia, вектор pFLD1 Pichi pastoris, вектор pGAPZA, B & C Pichia pastoris, вектор pPIC3.5K Pichia, вектор pPIC6 A, B & C Pichia, вектор pPIC9K Pichia, pTEF1/Zeo, дрожжевой вектор pYES2, дрожжевой вектор pYES2/CT, дрожжевой вектор pYES2/NT A, B & C или дрожжевой вектор pYES3/CT.

Векторы водорослей включают, например, вектор pChlamy-4 или вектор MCS.

Векторы млекопитающих включают, например, векторы транзientной экспрессии или векторы стабильной экспрессии. Иллюстративные векторы транзientной экспрессии млекопитающих включают p3xFLAG-CMV-8, pFLAG-Мyc-CMV-19, pFLAG-Мyc-CMV-23, pFLAG-CMV-2, pFLAG-CMV-6a, b, c, pFLAG-CMV-5.1, pFLAG-CMV-5a, b, c, p3xFLAG-CMV-7.1, pFLAG-CMV-20, p3xFLAG-Мyc-CMV-24, pCMV-FLAG-MAT1, pCMV-FLAG-MAT2, pBICEP-CMV-3 или pBICEP-CMV-4. Иллюстративные векторы стабильной экспрессии млекопитающих включают pFLAG-CMV-3, p3xFLAG-CMV-9, p3xFLAG-CMV-13, pFLAG-Мyc-CMV-21, p3xFLAG-Мyc-CMV-25, pFLAG-CMV-4, p3xFLAG-CMV-10, p3xFLAG-CMV-14, pFLAG-Мyc-CMV-22, p3xFLAG-Мyc-CMV-26, pBICEP-CMV-1 или pBICEP-CMV-2.

В некоторых случаях для получения полипептида цитокина (например, IL-2), описанного в данном документе, используют бесклеточную систему. В некоторых случаях бесклеточная система содержит смесь цитоплазматических и/или ядерных компонентов из клетки и подходит для синтеза нуклеиновых кислот *in vitro*. В некоторых случаях в бесклеточной системе применяют компоненты прокариотических клеток. В других случаях в бесклеточной системе применяют компоненты эукариотических клеток. Синтез нуклеиновых кислот достигается в бесклеточной системе, например, на основе клетки дрозофилы, яйца *Xenopus*, архей или клеток HeLa. Иллюстративные бесклеточные системы включают систему на основе экстракта S30 *E. coli*, систему S30 *E. coli* T7 или PURExpress®, XpressCF и XpressCF+.

Бесклеточные системы трансляции содержат разные компоненты, как, например, плазмиды, мРНК, ДНК, тРНК, синтетазы, факторы высвобождения, рибосомы, белки-шапероны, факторы инициации и элонгации трансляции, природные и/или неприродные аминокислоты и/или другие компоненты, применяемые для экспрессии белка. Такие компоненты необязательно модифицируют для повышения выхода, увеличения скорости синтеза, повышения соответствия белкового продукта или встраивания неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления цитокины, описанные в данном документе, синтезируют с применением бесклеточных систем трансляции, описанных в US 8778631; US 2017/0283469; US 2018/0051065; US 2014/0315245; или US 8778631. В некоторых вариантах осуществления бесклеточные системы трансляции включают модифицированные факторы высвобождения или даже удаление одного или нескольких факторов высвобождения из системы. В некоторых вариантах осуществления бесклеточные системы трансляции содержат пониженную концентрацию протеазы. В некоторых вариантах осуществления бесклеточные системы трансляции содержат модифицированные тРНК с переназначенными кодонами, применяемыми для кодирования неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления синтетазы, описанные в данном документе, предназначенные для встраивания неприродных аминокислот, применяют в бесклеточных системах трансляции. В некоторых вариантах осуществления тРНК предварительно загружают неприродными аминокислотами с применением ферментативных или химических способов перед добавлением в бесклеточную систему трансляции. В некоторых вариантах осуществления компоненты для бесклеточной системы трансляции получают из модифицированных организмов, таких как модифицированные бактерии, дрожжи или другой организм.

В некоторых вариантах осуществления полипептид цитокина (например, IL-2) получают в виде циркулярно пермутированной формы либо с помощью системы экспрессии хозяина, либо с помощью бесклеточной системы.

Получение полипептида цитокина, содержащего неприродную аминокислоту.

В настоящем изобретении можно использовать ортогональный или расширенный генетический код, в котором один или несколько конкретных кодонов, присутствующих в последовательности нуклеиновой кислоты полипептида цитокина (например, IL-2), предназначены для кодирования неприродной аминокислоты, чтобы ее можно было генетически встроить в цитокин (например, IL-2) с использованием ортогональной пары тРНК-синтаза/тРНК. Ортогональная пара тРНК-синтаза/тРНК способна загружать тРНК неприродной аминокислотой и способна встраивать эту неприродную аминокислоту в полипептидную цепь в ответ на кодон.

В некоторых случаях кодон представляет собой амбер-кодон, охра-кодон, опал-кодон или квадруплетный кодон. В некоторых случаях кодон соответствует ортогональной тРНК, которая будет применяться для переноса неприродной аминокислоты. В некоторых случаях кодон представляет собой амбер-кодон. В других случаях кодон представляет собой ортогональный кодон.

В некоторых случаях кодон представляет собой квадруплетный кодон, который может декодироваться ортогональной рибосомой *ribo-Q1*. В некоторых случаях квадруплетный кодон является таким, как показано в Neumann, et al., "Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome," *Nature*, 464(7287): 441-444 (2010).

В некоторых случаях кодон, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой перекодированный кодон, например, синонимичный кодон или редкий кодон, который заменен альтернатив-

ным кодоном. В некоторых случаях перекодированный кодон является таким, как описано в Napolitano, et al., "Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in *Escherichia coli*," PNAS, 113(38): E5588-5597 (2016). В некоторых случаях перекодированный кодон является таким, как описано в Ostrov et al., "Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome," Science 353(6301): 819-822(2016).

В некоторых случаях используют неприродные нуклеиновые кислоты, что приводит к встраиванию одной или нескольких неприродных аминокислот в цитокин (например, IL-2). Иллюстративные неприродные нуклеиновые кислоты включают без ограничения урацил-5-ил, гипоксантин-9-ил (I), 2-аминоаденин-9-ил, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Определенные неприродные нуклеиновые кислоты, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-замещенные пурины, N-6-замещенные пурины, O-6-замещенные пурины, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-метилцитозин, те, которые повышают стабильность образования дуплекса, универсальные нуклеиновые кислоты, гидрофобные нуклеиновые кислоты, разнородные нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты с увеличенным размером, фторированные нуклеиновые кислоты, 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил-, другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 5-пропинил- ($C\equiv C-CH_3$ -) урацил, 5-пропинилцитозин, другие алкильные производные пиримидиновых нуклеиновых кислот, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил-, другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин, 7-метиладенин, 2-Ф-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин, 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 3-деазагуанин, 3-деазааденин, трициклические пиримидины, феноксазинцитидин ([5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотиазинцитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензотиазин-2(3H)-он), G-зажимы, феноксазинцитидин (например, 9-(2-аминоэтокси)-H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолцитидин (2H-пиримидо[4,5-b]индол-2-он), пиридоиндолцитидин (H-пиридо[3',2':4,5]пирроло[2,3-d]пиримидин-2-он), те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, 7-деазааденин, 7-деазагуанозин, 2-аминопиримидин, 2-пиридон, азацитозин, 5-бромцитозин, бромуррацил, 5-хлорцитозин, хлорированный цитозин, циклоцитозин, цитозин-арабинозид, 5-фторцитозин, фторпиримидин, фторурацил, 5,6-дигидроцитозин, 5-йодцитозин, гидроксимочевина, йодурацил, 5-нитроцитозин, 5-бромуррацил, 5-хлоруррацил, 5-фторуррацил и 5-йодурацил, 2-аминоаденин, 6-тиогуанин, 2-тиотимин, 4-тиотимин, 5-пропинилурацил, 4-тиоурацил, N4-этилцитозин, 7-деазагуанин, 7-деаза-8-азагуанин, 5-гидроксцитозин, 2'-дезоксуридин, 2-амино-2'-дезоксаденозин и те, которые описаны в патентах США № 3687808; 4845205; 4910300; 4948882; 5093232; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5645985; 5681941; 5750692; 5763588; 5830653 и 6005096; WO 99/62923; Kandimalla et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; и Sanghvi, Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke and Lebleu Eds., CRC Press, 1993, 273-288. Дополнительные модификации оснований можно найти, например, в патенте США № 3687808; Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; и Sanghvi, Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, страницы 289-302, Crooke and Lebleu ed., CRC Press, 1993.

Неприродные нуклеиновые кислоты, содержащие различные гетероциклические основания и различные сахарные фрагменты (и аналоги сахаров), доступны в данной области техники, и нуклеиновые кислоты в некоторых случаях содержат одно или несколько гетероциклических оснований, отличных от основных пяти компонентов-оснований встречающихся в природе нуклеиновых кислот. Например, гетероциклическое основание включает в некоторых случаях урацил-5-ильные, цитозин-5-ильные, аденин-7-ильные, аденин-8-ильные, гуанин-7-ильные, гуанин-8-ильные, 4-аминопирроло[2,3-d]пиримидин-5-ильные, 2-амино-4-оксопирроло[2,3-d]пиримидин-5-ильные, 2-амино-4-оксопирроло[2,3-d]пиримидин-3-ильные группы, где пурины присоединены к сахарному фрагменту нуклеиновой кислоты через положение 9, пиримидины через положение 1, пирролопиримидины через положение 7 и пиразолопиримидины через положение 1.

В некоторых вариантах осуществления аналоги нуклеотидов также модифицированы в фосфатном фрагменте. Модифицированные фосфатные фрагменты включают без ограничения фрагменты с модификацией в связи между двумя нуклеотидами и включают, например, фосфоротиоат, хиральный фосфо-

ротиоат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоалкилфосфотриэфир, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонат и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты. Следует понимать, что эти фосфатные или модифицированные фосфатные связи между двумя нуклеотидами образованы посредством 3'-5'-связи или 2'-5'-связи, и связь характеризуется инвертированной полярностью, такой как с 3'-5' на 5'-3' или с 2'-5' на 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот. Во многих патентах США описывается, как получать и применять нуклеотиды, содержащие модифицированные фосфаты, и они включают без ограничения 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

В некоторых вариантах осуществления неприродные нуклеиновые кислоты включают 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидронуклеозиды (PCT/US2002/006460), 5'-замещенные производные ДНК и РНК (PCT/US2011/033961; Saha et al., *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 788-789; Wang et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9, 885-890; и Mikhailov et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, 10(1-3), 339-343; Leonid et al., 1995, 14(3-5), 901-905; и Eppacher et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2004, 87, 3004-3020; PCT/JP2000/004720; PCT/JP2003/002342; PCT/JP2004/013216; PCT/JP2005/020435; PCT/JP2006/315479; PCT/JP2006/324484; PCT/JP2009/056718; PCT/JP2010/067560), или 5'-замещенные мономеры, полученные в виде монофосфата с модифицированными основаниями (Wang et al., *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2004, 23 (1 & 2), 317-337).

В некоторых вариантах осуществления неприродные нуклеиновые кислоты включают модификации в 5'-положении и 2'-положении сахарного кольца (PCT/US94/02993), например, 5'-CH₂-замещенные 2'-О-защищенные нуклеозиды (Wu et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2000, 83, 1127-1143 и Wu et al., *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 921-924). В некоторых случаях неприродные нуклеиновые кислоты включают нуклеозидные димеры с амидной связью, полученные для встраивания в олигонуклеотиды, где 3'-связанный нуклеозид в димере (от 5' к 3') содержит 2'-OCH₃ и 5'-(S)-CH₃ (Mesmaeker et al., *Synlett*, 1997, 1287-1290). Неприродные нуклеиновые кислоты могут содержать 2'-замещенные 5'-CH₂ (или O) модифицированные нуклеозиды (PCT/US92/01020). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать 5'-метиленфосфонатные мономеры ДНК и РНК, а также димеры (Bohringer et al., *Tet. Lett.*, 1993, 34, 2723-2726; Collingwood et al., *Synlett*, 1995, 7, 703-705; и Hutter et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2002, 85, 2777-2806). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать 5'-фосфонатные мономеры, имеющие 2'-замещение (US 2006/0074035), и другие модифицированные 5'-фосфонатные мономеры (WO 1997/35869). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать 5'-модифицированные метиленфосфонатные мономеры (EP614907 и EP629633). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать аналоги 5'- или 6'-фосфонатных рибонуклеозидов, содержащие гидроксильную группу в 5'- и/или 6'-положении (Chen et al., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 2002, 777, 1783-1786; Jung et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, 8, 2501-2509; Gallier et al., *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 925-933; и Hampton et al., *J. Med. Chem.*, 1976, 19(8), 1029-1033). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать 5'-фосфонатные дезоксирибонуклеозидные мономеры и димеры, имеющие 5'-фосфатную группу (Nawrot et al., *Oligonucleotides*, 2006, 16(1), 68-82). Неприродные нуклеиновые кислоты могут включать нуклеозиды, имеющие 6'-фосфонатную группу, в которой 5'- или/и 6'-положение является незамещенным или замещенным трио-трет-бутильной группой (SC(CH₃)₃) (и ее аналогами); метиленаминогруппой (CH₂NH₂) (и ее аналогами) или цианогруппой (CN) (и ее аналогами) (Fairhurst et al., *Synlett*, 2001, 4, 467-472; Kappler et al., *J. Med. Chem.*, 1986, 29, 1030-1038; Kappler et al., *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 1179-1184; Vrudhula et al., *J. Med. Chem.*, 1987, 30, 888-894; Hampton et al., *J. Med. Chem.*, 1976, 19, 1371-1377; Geze et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105(26), 7638-7640; и Hampton et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95(13), 4404-4414).

В некоторых вариантах осуществления неприродные нуклеиновые кислоты также содержат модификации сахарного фрагмента. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты содержат один или несколько нуклеозидов, где сахарная группа была модифицирована. Такие нуклеозиды с модифицированным сахаром способны придавать повышенную стабильность в отношении нуклеаз, повышенную аффинность связывания или некоторые другие полезные биологические свойства. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты содержат химически модифицированный фрагмент рибофуранозного кольца. Примеры химически модифицированных рибофуранозных колец включают без ограничения добавление замещающих групп (включая 5'- и/или 2'-замещающие группы, соединение мостиком двух атомов кольца с образованием бициклических нуклеиновых кислот (BNA), замену атома кислорода рибозильного кольца на S, N(R) или C(R₁)(R₂) (R=H, C₁-C₁₂-алкил или защитную группу); и их комбинации. Примеры химически модифицированных сахаров можно найти в WO 2008/101157, US 2005/0130923 и WO 2007/134181.

В некоторых случаях модифицированная нуклеиновая кислота содержит модифицированные сахара или аналоги сахаров. Таким образом, в дополнение к рибозе и дезоксирибозе сахарный фрагмент может представлять собой пентозу, дезоксирибозу, гексозу, дезоксирибозу, глюкозу, арабинозу, ксилозу, ликсозу или циклопентильную группу, представляющую собой "аналог" сахара. Сахар может быть в пирано-

зильной или фуранозильной форме. Сахарный фрагмент может представлять собой фуранозид рибозы, дезоксирибозы, арабинозы или 2'-О-алкилрибозы, и сахар может быть присоединен к соответствующим гетероциклическим основаниям либо в [альфа], либо в [бета]-аномерной конфигурации. Модификации сахара включают без ограничения аналоги 2'-алкокси-РНК, аналоги 2'-амино-РНК, 2'-фтор-ДНК и 2'-алкокси- или химеры amino-РНК/ДНК. Например, модификация сахара может включать 2'-О-метилуридин или 2'-О-метилцитидин. Модификации сахара включают 2'-О-алкилзамещенные дезоксирибонуклеозиды и 2'-О-этиленгликоль-подобные рибонуклеозиды. Известно получение этих Сахаров или аналогов Сахаров и соответствующих "нуклеозидов", где такие сахара или аналоги присоединены к гетероциклическому основанию (основанию нуклеиновой кислоты). Модификации сахара также могут быть получены и объединены с другими модификациями.

Модификации сахарного фрагмента включают природные модификации рибозы и дезоксирибозы, а также не природные модификации. Модификации сахара включают без ограничения следующие модификации в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил или C₂-C₁₀-алкенил и алкинил. 2'-Модификации сахара также включают без ограничения -O[(CH₂)_nO]_m CH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nCH₃, -O(CH₂)_nONH₂ и -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10.

Другие модификации в 2'-положении включают без ограничения низший C₁-C₁₀-алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил, O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотида или группу для улучшения фармакодинамических свойств олигонуклеотида, а также другие заместители с аналогичными свойствами. Аналогичные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в сахаре, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных олигонуклеотидах и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Модифицированные сахара также включают сахара, которые содержат модификации в мостиковом кислороде кольца, такие как CH₂ и S. Нуклеотиды с аналогами сахаров также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты вместо пентофуранозильного сахара. Существует множество патентов США, в которых описывается получение таких модифицированных структур сахаров, и в которых подробно излагается и описывается ряд модификаций оснований, например, патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5,457,187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941 и 5700920, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Примеры нуклеиновых кислот, имеющих модифицированные сахарные фрагменты, включают без ограничения нуклеиновые кислоты, содержащие замещающие группы, представляющие собой 5'-винильную, 5'-метильную (R или S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ и 2'-O(CH₂)₂OCH₃. Заместитель в 2'-положении также может быть выбран из аллила, amino, азидо, тио, O-аллила, O-(C₁-C₁₀-алкила), OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) и O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, включают одну или несколько бициклических нуклеиновых кислот. В определенных таких вариантах осуществления бициклическая нуклеиновая кислота содержит мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, предусмотренные в данном документе, включают одну или несколько бициклических нуклеиновых кислот, где мостик содержит 4'-2'-бициклическую нуклеиновую кислоту. Примеры таких 4'-2'-бициклических нуклеиновых кислот включают без ограничения одну из формул: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' и их аналоги (см. патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' и ее аналоги (см. WO 2009/006478, WO 2008/150729, US 2004/0171570, патент США № 7427672, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 209, 74, 118-134 и WO 2008/154401). Также см., например: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; патенты США № 4849513; 5015733; 5118800; 5118802; 7053207; 6268490; 6770748; 6794499; 7034133; 6525191; 6670461 и 7399845; международные публикации № WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570, WO 2007/090071 и WO 2007/134181; публикации патентов США № US 2004/0171570, US 2007/0287831 и US 2008/0039618; предварительные заявки на патент США № 60/989574, 61/026995, 61/026998, 61/056564, 61/086,231, 61/097787 и 61/099844; и международные заявки на патент № PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922 и PCT/DK98/00393.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты включают связанные нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты могут быть связаны вместе с применением любой связи между нуклеиновыми кислотами. Два основных класса групп, связывающих между собой нуклеиновые кислоты, определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие связи между нуклеиновыми кислотами включают без ограничения фосфодиэфирные, фосфотриэфирные, метилфосфонатные, фосфорамидатные и фосфоротиоатные (P=S). Типичные не содержащие фосфор группы, связывающие между собой нуклеиновые кислоты, включают без ограничения метиленметилямино (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), тиодифирную (-O-C(O)-S-), тионокарбаматную (-O-C(O)(NH)-S-); силоксановую (-O-Si(H)₂-O-) и N,N*-диметилгидразиную (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)). В определенных вариантах осуществления связи между нуклеиновыми кислотами, имеющие хиральный атом, можно получать в виде рацемической смеси, в виде отдельных энантиомеров, например, алкилфосфонатов и фосфоротиоатов. Неприродные нуклеиновые кислоты могут содержать одну модификацию. Неприродные нуклеиновые кислоты могут содержать несколько модификаций в одном из фрагментов или между различными фрагментами.

Модификации фосфата остова в нуклеиновой кислоте включают без ограничения метилфосфонат, фосфоротиоат, фосфорамидат (мостиковый или не мостиковый), фосфотриэфир, фосфородитиоат, фосфодитиоат и боранофосфат и могут применяться в любой комбинации. Другие нефосфатные связи также можно применять.

В некоторых вариантах осуществления модификации остова (например, метилфосфонатные, фосфоротиоатные, фосфорамидатные и фосфородитиоатные межнуклеотидные связи) могут придавать иммуномодулирующую активность модифицированной нуклеиновой кислоте и/или повышать ее стабильность *in vivo*.

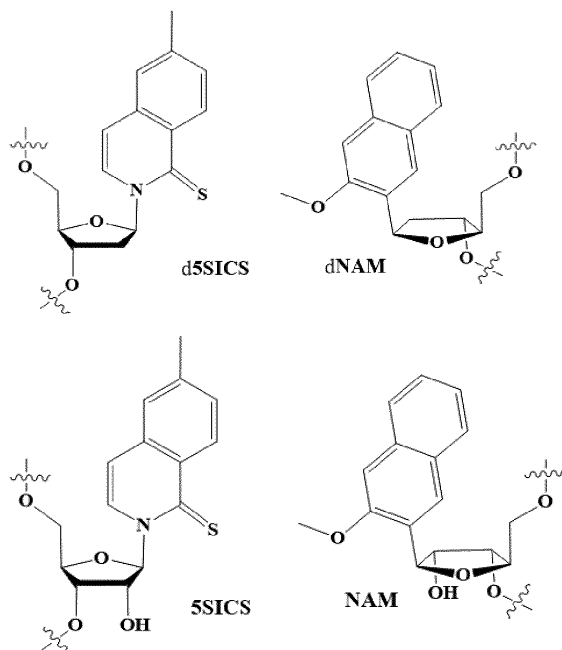
В некоторых случаях производное фосфора (или модифицированная фосфатная группа) присоединена к сахару или фрагменту аналога сахара и может представлять собой монофосфат, дифосфат, трифосфат, алкилфосфонат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфорамидат или т.п. Иллюстративные полинуклеотиды, содержащие модифицированные фосфатные связи или нефосфатные связи, можно найти в Peyrottes et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; и Schultz et al., (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973; Matteucci, 1997, "Oligonucleotide Analogs: an Overview" in *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (Chadwick and Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY; Zon, 1993, "Oligonucleoside Phosphorothioates" в *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties*, Humana Press, pp. 165-190; Miller et al., 1971, *JACS* 93:6657-6665; Jager et al., 1988, *Biochem.* 27:7247-7246; Nelson et al., 1997, *JOC* 62:7278-7287; патенте США № 5453496 и Micklefield, 2001, *Curr. Med. Chem.* 8: 1157-1179.

В некоторых случаях модификация остова включает замену фосфодиэфирной связи альтернативным фрагментом, таким как анионная, нейтральная или катионная группа. Примеры таких модификаций включают анионную межнуклеозидную связь; модификацию фосфорамидата от N3' к P5'; боранофосфатную ДНК; проолигонуклеотиды; нейтральные межнуклеозидные связи, такие как метилфосфонаты; ДНК с амидной связью; метиленовые(метилямино) связи; формацетальные и тиоформацетальные связи; остовы, содержащие сульфонильные группы; морфолиновые олигонуклеотиды; пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и положительно заряженные дезоксирибонуклеиновые гуанидиновые (DNG) олигонуклеотиды (Micklefield, 2001, *Current Medicinal Chemistry* 8: 1157-1179). Модифицированная нуклеиновая кислота может содержать химерный или смешанный остов, содержащий одну или несколько модификаций, например, комбинацию фосфатных связей, такую как комбинация фосфодиэфирных и фосфоротиоатных связей.

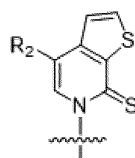
Заместители для фосфата включают, например, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межнуклеозидные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межнуклеозидные связи, или одну или несколько короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межнуклеозидных связей. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразинные остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, имеющие смешанные части компонентов N, O, S и CH₂. Во многих патентах США раскрыто, как получать и применять эти типы заместителей фосфата, и они включают без ограничения патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439. Также следует понимать, что при замене нуклеотида можно заменять как сахарный, так и фосфатный фрагменты нуклеотида, например, с помощью связи амидного типа (аминоэтилглицин) (PNA). В патентах США № 5539082; 5714331 и 5719262 описывается, как получать и применять молекулы PNA, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. См. также Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500. Также возможно связать другие типы молекул (конъюгатов) с нуклеотидами или аналогами нуклеотидов, чтобы усилить, например, поглощение клеткой. Конъюгаты могут быть химически связаны с нуклеотидом или аналогами нуклеотидов. Такие конъюгаты включают без ограни-

чения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), холиновую кислоту (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), простой тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., Ann. KY. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBOJ, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-S-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) или октадециламиноновый или гексиламинокарбонилостероидный фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Во множестве патентов США описывается получение таких конъюгатов, и они включают без ограничения патенты США № 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941.

В некоторых случаях неприродные нуклеиновые кислоты дополнительно образуют неприродные пары оснований. Иллюстративные неприродные нуклеотиды, способные к образованию неприродной пары оснований ДНК или РНК (UBP) в условиях *in vivo*, включают без ограничения TPT3, dTPT3, 5SICS, d5SICS, NaM, dNaM, CNMO, dCNMO и их комбинации. Другие примеры неприродных нуклеотидов, способных к образованию неприродных UBPs, которые можно использовать для получения конъюгатов ПЛ-2, раскрываемых в данном документе, можно найти в Dien et al., J Am Chem Soc., 2018, 140:16115-16123; Feldman et al., J Am Chem Soc., 2017, 139:11427-11433; Ledbetter et al., J Am Chem Soc., 2018, 140:758-765; Dhami et al., Nucleic Acids Res. 2014, 42:10235-10244; Malyshev et al., Nature, 2014, 509:385-388; Betz et al., J Am Chem Soc., 2013, 135:18637-18643; Lavergne et al., J Am Chem Soc. 2013, 135:5408-5419 и Malyshev et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:12005-12010. В некоторых вариантах осуществления неприродные нуклеотиды включают:



В некоторых вариантах осуществления неприродные нуклеотиды, которые могут быть использованы для получения конъюгатов ПЛ-2, раскрываемых в данном документе, могут быть получены из соединения формулы,

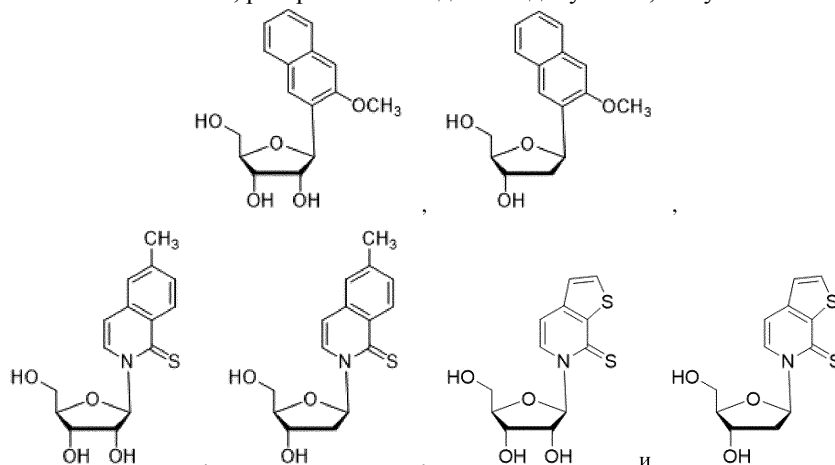


где R_2 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, метокси, метантиола,

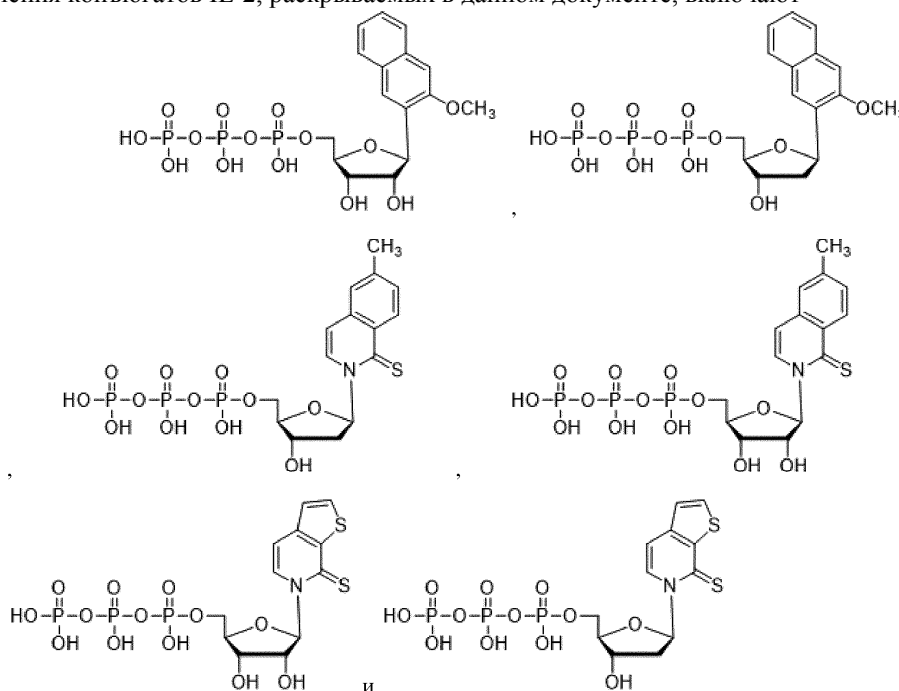
метанселено, галогена, циано и азидо; и

волнистой линией показана связь с рибозилом или 2'-дезоксирибозилом, где 5'-гидрокси-группа рибозильного или 2'-дезоксирибозильного фрагмента находится в свободной форме или необязательно связана с группой монофосфата, дифосфата или трифосфата.

В некоторых вариантах осуществления не природные нуклеотиды, которые могут быть использованы для получения конъюгатов IL-2, раскрываемых в данном документе, могут быть получены из



В некоторых вариантах осуществления не природные нуклеотиды, которые могут быть использованы для получения конъюгатов IL-2, раскрываемых в данном документе, включают



или их соли.

В некоторых вариантах осуществления не природная пара оснований генерирует не природную аминокислоту, описанную в Dumas et al., "Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology," *Chemical Science*, 6: 50-69 (2015).

В некоторых вариантах осуществления не природную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью синтетического кодона, содержащего не природную нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях не природную аминокислоту встраивают в цитокин с помощью ортогональной модифицированной пары синтетеза/тРНК. Такие ортогональные пары содержат не природную синтетазу, которая способна загружать не природную тРНК не природной аминокислотой, при этом минимизируя загрузку а) других эндогенных аминокислот на не природную тРНК и б) не природных аминокислот на другие эндогенные тРНК. Такие ортогональные пары содержат тРНК, которые способны загружаться не природной синтетазой, избегая при этом загрузки другими эндогенными аминокислотами с помощью эндогенных синтетаз. В некоторых вариантах осуществления такие пары идентифицированы у различных организмов, таких как бактерии, дрожжи, археи или люди. В некоторых вариантах осуществления ортогональная пара синтетеза/тРНК содержит компоненты из одного организма. В некоторых вариантах осуществления ортогональная пара синтетеза/тРНК содержит компоненты из двух различных организ-

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью пары Ec-Tyr/tPHK_{CUA} или Ec-Leu/tPHK_{CUA}. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью пары Ec-Tyr/tPHK_{CUA} или Ec-Leu/tPHK_{CUA}, включают без ограничения производные фенилаланина, содержащие бензофеноновые, кетоновые, йодидные или азидные заместители; O-пропаргилтирозин; α-аминокаприловую кислоту, O-метилтирозин, O-нитробензилцистеин и 3-(нафталин-2-иламино)-2-аминопропановую кислоту.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин (например, полипептид IL) с помощью пары пирролизил-tPHK. В некоторых случаях PylRS получают из археобактерии, например, из метаногенной археобактерии. В некоторых случаях PylRS получают из *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* или *Methanosarcina acetivorans*. Иллюстративные UAA, которые можно встраивать с помощью пары пирролизил-tPHK, включают без ограничения амид- и карбамат-замещенные лизины, такие как 2-амино-6-((R)-тетрагидрофуран-2-карбоксамидо)гексановая кислота, N-ε-D-пролил-L-лизин и N-ε-циклопентилоксикарбонил-L-лизин; N-ε-акрилоил-L-лизин; N-ε-[(1-(6-нитробензо[d][1,3]диоксол-5-ил)этокси)карбонил]-L-лизин и N-ε-(1-метилциклопро-2-ен-карбоксамидо)лизин. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, раскрытые в данном документе, могут быть получены путем применения tPHK *M. mazei*, которая селективно нагружается неприродной аминокислотой, такой как N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин (AzK), с помощью пирролизил-tPHK-синтетазы *M. barkeri* (MbPylRS). Специалистам в данной области техники известны и другие способы, как, например, способы, раскрытые в Zhang et al., *Nature* 2017, 551(7682): 644-647.

В некоторых случаях неприродную аминокислоту встраивают в цитокин, описанный в данном документе (например, полипептид IL), с помощью синтетазы, раскрытой в US 9988619 и US 9938516.

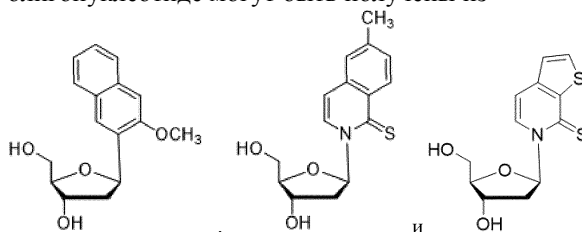
Клетку-хозяина, в которую вводят раскрытые в данном документе конструкции или векторы, культивируют или поддерживают в подходящей среде таким образом, что продуцируются tPHK, tPHK-синтетаза и представляющий интерес белок. Среда также содержит неприродную(неприродные) аминокислоту(аминокислоты), так что в представляющий интерес белок встраивается(встраиваются) неприродная(неприродные) аминокислота(аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления нуклеозидтрифосфатный переносчик (NTT) из бактерии, растения или водоросли также присутствует в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, получают путем использования клетки-хозяина, которая экспрессирует NTT. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный нуклеозидтрифосфатный переносчик, используемый в клетке-хозяине, может быть выбран из TrNTT1, TrNTT2, TrNTT3, TrNTT4, TrNTT5, TrNTT6, TrNTT7, TrNTT8 (*T. pseudonana*), PtNTT1, PtNTT2, PtNTT3, PtNTT4, PtNTT5, PtNTT6 (*P. tricornutum*), GsNTT (*Galdieria sulphuraria*), AtNTT1, AtNTT2 (*Arabidopsis thaliana*), CtNTT1, CtNTT2 (*Chlamydia trachomatis*), PamNTT1, PamNTT2 (*Protochlamydia amoebophila*), CcNTT (*Caedibacter caryophilus*), RpNTT1 (*Rickettsia prowazekii*). В некоторых вариантах осуществления NTT выбран из PtNTT1, PtNTT2, PtNTT3, PtNTT4, PtNTT5 и PtNTT6. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT1. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT2. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT4. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT5. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT6. Другие NTT, которые могут быть использованы, раскрыты в Zhang et al., *Nature* 2017, 551(7682): 644-647; Malyshev et al. *Nature* 2014 (509(7500), 385-388; и Zhang et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114:1317-1322.

Ортогональная пара tPHK-синтетазы/tPHK загружает tPHK неприродной аминокислотой и встраивает неприродную аминокислоту в полипептидную цепь в ответ на кодон. Иллюстративные пары aaRS-tPHK включают без ограничения пары aaRS/tPHK *Methanococcus jannaschii* (Mj-Tyr), пары TyrRS *E. coli* (Ec-Tyr)/tPHK_{CUA} *B. stearothermophilus*, пары LeuRS (Ec-Leu) *E. coli*/tPHK_{CUA} *B. stearothermophilus* и пары пирролизил-tPHK. Другие пары aaRS-tPHK, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают полученные из *M. mazei*, описанные в Feldman et al., *J Am Chem Soc.*, 2018 140:1447-1454 и Zhang et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114:1317-1322.

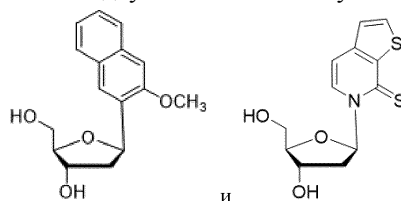
В некоторых вариантах осуществления представлены способы получения конъюгатов IL-2, раскрываемых в данном документе, в клеточной системе, которая экспрессирует NTT и tPHK-синтетазу. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, NTT выбран из PtNTT1, PtNTT2, PtNTT3, PtNTT4, PtNTT5 и PtNTT6, а tPHK-синтетаза выбрана из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* и *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT1, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT2, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT3, а tPHK-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*.

NTT представляет собой PtNTT4, а тРНК-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT5, а тРНК-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*. В некоторых вариантах осуществления NTT представляет собой PtNTT6, а тРНК-синтетаза получена из *Methanococcus jannaschii*, *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus* или *M. mazei*.

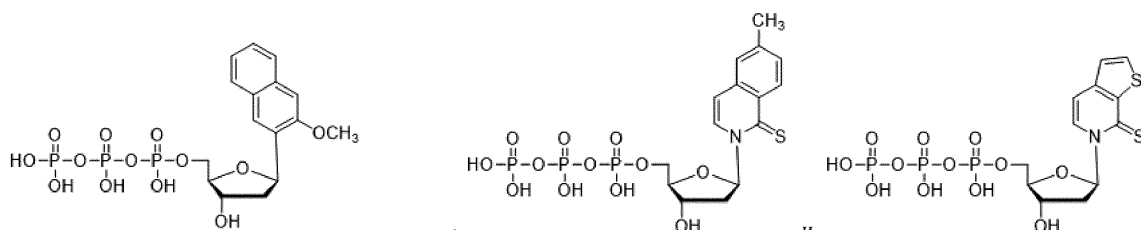
В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, могут быть получены в клетке, такой как *E. coli*, содержащей (а) нуклеозидтрифосфатный переносчик PtNTT2 (включающий усеченный вариант, в котором первые 65 аминокислотных остатков полноразмерного белка удалены), (b) плазмиду, содержащую двухнитевый олигонуклеотид, который кодирует вариант IL-2, имеющий требуемую аминокислотную последовательность, и который содержит неприродную пару оснований, содержащую первый неприродный нуклеотид и второй неприродный нуклеотид, для обеспечения кодона в требуемом положении, в которое будет встроена неприродная аминокислота, такая как N6-((2-азидозтокси)карбонил)-L-лизин (AzK), (с) плазмиду, кодирующую тРНК, которая получена из *M. mazei* и которая содержит неприродный нуклеотид, для обеспечения распознаваемого антикодона (к кодону варианта IL-2) вместо своей нативной последовательности, и (d) плазмиду, кодирующую полученную из *M. barkeri* пирролизил-тРНК-синтетазу (*Mb* PylRS), которая может представлять собой ту же плазмиду, которая кодирует тРНК, или другую плазмиду. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления клетка дополнена дезоксириботрифосфатами, содержащими одно или несколько неприродных оснований. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления клетка дополнена риботрифосфатами, содержащими одно или несколько неприродных оснований. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления клетки дополнены одной или несколькими неприродными аминокислотами, такими как N6-((2-азидозтокси)карбонил)-L-лизин (AzK). В некоторых вариантах осуществления двухнитевой олигонуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность желаемого варианта IL-2, содержит кодон АХС, например, в положении 9, 16, 19, 20, 23, 26, 88, 91, 100, 109, 119, 123, 126, 127 или 131 последовательности, которая кодирует белок, характеризующийся SEQ ID NO: 4 (IL-2_C125S), или в положении 8, 15, 18, 19, 22, 25, 87, 90, 99, 108, 118, 122, 125, 126 или 130 последовательности, которая кодирует белок, характеризующийся SEQ ID NO: 3 (альдеслейкин), где Х представляет собой неприродный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит плазмиду, которая может представлять собой плазмиду экспрессии белка или другую плазмиду, которая кодирует ген ортогональной тРНК из *M. mazei*, которая содержит АХС-соответствующий антикодон GYT вместо своей нативной последовательности, где Y представляет собой неприродный нуклеотид, который является комплементарным и может быть таким же или отличаться от неприродного нуклеотида в кодоне. В некоторых вариантах осуществления неприродный нуклеотид в кодоне отличается от неприродного нуклеотида и комплементарен неприродному нуклеотиду в антикодоне. В некоторых вариантах осуществления неприродный нуклеотид в кодоне является таким же, как неприродный нуклеотид в антикодоне. В некоторых вариантах осуществления первый неприродный нуклеотид и второй неприродный нуклеотид неприродной пары оснований в двухнитевом олигонуклеотиде могут быть получены из



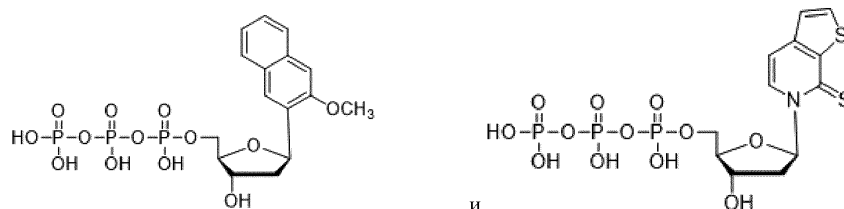
В некоторых вариантах осуществления первый неприродный нуклеотид и второй неприродный нуклеотид неприродной пары оснований в двухнитевом олигонуклеотиде могут быть получены из



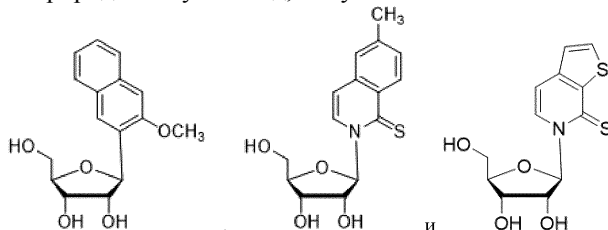
В некоторых вариантах осуществления трифосфаты первого и второго неприродных нуклеотидов включают



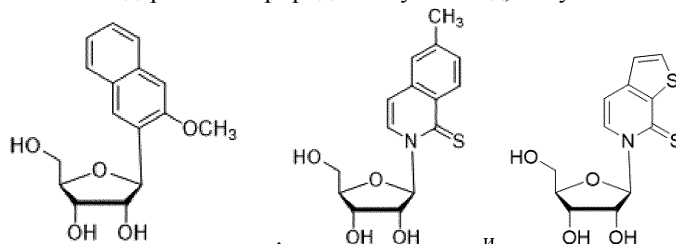
или их соли. В некоторых вариантах осуществления трифосфаты первого и второго неприродных нуклеотидов включают



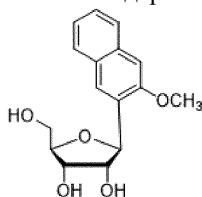
или их соли. В некоторых вариантах осуществления мРНК, полученная из двухнитевого олигонуклеотида, содержащего первый неприродный нуклеотид и второй неприродный нуклеотид, может содержать кодон, содержащий неприродный нуклеотид, полученный из



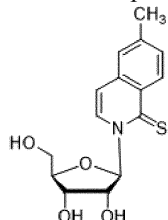
В некоторых вариантах осуществления тРНК *M. mazei* может содержать антикодон, содержащий неприродный нуклеотид, который распознает кодон, содержащие неприродный нуклеотид мРНК. Антикодон в тРНК *M. mazei* может содержать неприродный нуклеотид, полученный из



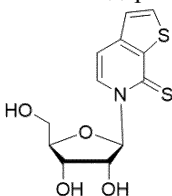
В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



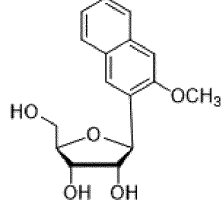
В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



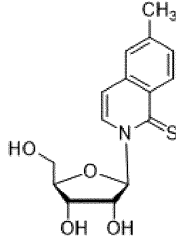
В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



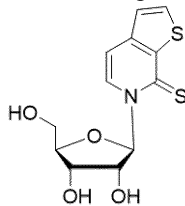
В некоторых вариантах осуществления тРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



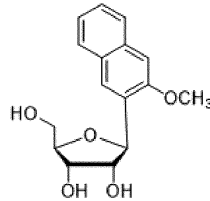
В некоторых вариантах осуществления тРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



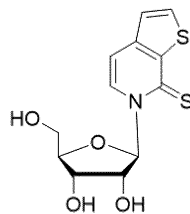
В некоторых вариантах осуществления тРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



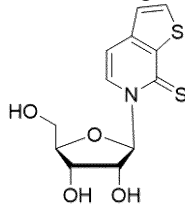
В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



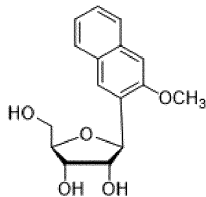
а тРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



а тРНК содержит неприродный нуклеотид, полученный из



Клетку-хозяина культивируют в среде, содержащей соответствующие питательные вещества и дополненной (а) трифосфатами дезоксирибонуклеозидов, содержащими одно или несколько неприродных оснований, которые необходимы для репликации плазмиды (плазмид), кодирующей (кодирующих) ген цитокина, содержащий кодон, (б) трифосфатами рибонуклеозидов, содержащими одно или несколько неприродных оснований, необходимых для транскрипции (i) мРНК, соответствующей кодирующей последовательности цитокина и содержащей кодон, содержащий одно или несколько неприродных основа-

ний, и (ii) тРНК, содержащей антикодон, содержащий одно или несколько неприродных оснований, и (с) неприродной (неприродными) аминокислотой (аминокислотами), подлежащими встраиванию в полипептидную последовательность представляющего интерес цитокина. Затем клетки-хозяева поддерживают в условиях, обеспечивающих экспрессию представляющего интерес белка.

Полученный в результате белок, содержащий одну или несколько неприродных аминокислот, например Azk, который экспрессируется, может быть очищен способами, известными специалистам в данной области техники, а затем может быть обеспечена его реакция с алкином, таким как DBCO, содержащим цепь PEG с требуемой средней молекулярной массой, как раскрывается в данном документе, в условиях, известных специалистам в данной области техники, с получением конъюгатов IL-2, раскрываемых в данном документе. Специалистам в данной области техники известны и другие способы, как, например, способы, раскрытые в Zhang et al., Nature 2017, 551(7682): 644-647, WO 2015157555, WO 2015021432, WO 2016115168, WO 2017106767, WO 2017223528, WO 2019014262, WO 2019014267, WO 2019028419 и WO 2019/028425.

В качестве альтернативы полипептид цитокина (например, IL-2), содержащий неприродную(неприродные) аминокислоту(аминокислоты), получают посредством введения в клетку-хозяина описанных в данном документе конструкций нуклеиновых кислот, содержащих тРНК и аминоацил-тРНК-синтазу и содержащих представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты с одним или несколькими ортогональными (стоп-)кодонами в рамке считывания. Клетку-хозяина культивируют в среде, содержащей соответствующие питательные вещества и дополненной (а) трифосфатами дезоксирибонуклеозидов, содержащими одно или несколько неприродных оснований, требуемых для репликации плазмиды(плазмид), кодирующей(кодирующих) ген цитокина и несущей(несущих) новый кодон и антикодон, (b) трифосфатами рибонуклеозидов, требуемыми для транскрипции мРНК, соответствующей (i) последовательности цитокина, содержащей кодон, и (ii) ортогональной тРНК, содержащей антикодон, и (с) неприродной(неприродными) аминокислотой(аминокислотами). Затем клетки-хозяева поддерживают в условиях, обеспечивающих экспрессию представляющего интерес белка. Неприродная (неприродные) аминокислота (аминокислоты) встраивается (встраиваются) в полипептидную цепь в ответ на неприродный кодон. Например, одна или несколько неприродных аминокислот встраиваются в полипептид цитокина (например, IL-2). В качестве альтернативы две или более неприродных аминокислот могут быть встроены в полипептид цитокина (например, IL-2) в двух или более сайтах белка.

После того, как цитокин (например, IL-2) со встроеной (встроенными) неприродной (неприродными) аминокислотой (аминокислотами) был получен в клетке-хозяине, его можно извлечь из нее с применением различных методик, известных из уровня техники, включая ферментативный, химический и/или осмотический лизис и физическое разрушение. Полипептид цитокина (например, IL-2) может быть очищен посредством стандартных методик, известных из уровня техники, таких как препаративная ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, аффинная хроматография, или посредством любой другой подходящей методики, известной специалистам в данной области техники.

Подходящие клетки-хозяева могут включать бактериальные клетки (например, *E. coli*, BL21(DE3)), но в наиболее подходящем случае клетки-хозяева являются эукариотическими клетками, например, клетками насекомых (например, представителя рода *Drosophila*, такого как *Drosophila melanogaster*), дрожжевыми клетками, клетками нематод (например, *C. elegans*), клетками мышей (например, *Mus musculus*) или млекопитающих (такими как клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки COS, клетки человека 293T, клетки HeLa, клетки NIH/3T3 и клетки эритролейкоза мыши (MEL)) или клетками человека или другими эукариотическими клетками. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области техники. Соответственно, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека, или клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления подходящие клетки-хозяева предусматривают *E. coli*.

Другими подходящими клетками-хозяевами, которые в целом можно использовать в вариантах осуществления настоящего изобретения, являются клетки, упомянутые в разделе "Примеры". Векторную ДНК можно вводить в клетки-хозяева с помощью обычных методик трансформации или трансфекции. Применяемые в данном документе термины "трансформация" и "трансфекция" предназначены для обозначения множества хорошо известных методик введения молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая совместное осаждение фосфатом кальция или хлоридом кальция, опосредованную DEAE-декстраном трансфекцию, липофекцию или электропорацию. Подходящие способы трансформации или трансфекции клеток-хозяев хорошо известны из уровня техники.

При создании линий клеток обычно предпочтительно получать стабильные линии клеток. Например, известно, что в случае стабильной трансфекции клеток млекопитающих в зависимости от применяемых вектора экспрессии и методики трансфекции только небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Для идентификации и отбора этих интегрантов в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном обычно вводят ген, который кодирует селективируемый маркер (например, для устойчивости к антибиотикам). Предпочтительные селективируемые маркеры включают маркеры, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или

метотрексат. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие селективируемый маркер, можно вводить в клетку-хозяина в том же векторе или можно вводить в отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфицированные введенной молекулой нуклеиновой кислоты, можно идентифицировать посредством отбора с лекарственным средством (например, клетки, которые содержат встроенный ген селективируемого маркера, выживут, тогда как другие клетки погибают).

В одном варианте осуществления описанные в данном документе конструкции интегрируют в геном клетки-хозяина. Преимущество стабильной интеграции состоит в том, что достигается однородность между отдельными клетками или клонами. Еще одно преимущество состоит в возможности осуществления отбора лучших продуцентов. Соответственно, необходимо создать стабильные линии клеток. В другом варианте осуществления описанными в данном документе конструкциями трансфицируют клетку-хозяина. Преимущество трансфекции клетки-хозяина конструкциями состоит в том, что выход белка может быть максимизирован. В одном аспекте описана клетка, содержащая конструкцию на основе нуклеиновой кислоты или вектор, описанный данным документе.

Фармацевтические композиции и составы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию и составы, описанные в данном документе, вводят субъекту посредством нескольких путей введения, включая без ограничения парентеральный, пероральный, буккальный, ректальный, подязычный или трансдермальный пути введения. В некоторых случаях парентеральное введение включает внутривенное, подкожное, внутримышечное, интрацеребральное, интраназальное, внутриартериальное, внутрисуставное, внутрикожное, интравитреальное, внутрикостную инфузию, интраперитонеальное или интратекальное введение. В некоторых случаях фармацевтическую композицию составляют для местного введения. В других случаях фармацевтическую композицию составляют для системного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, вводят субъекту посредством внутривенного, подкожного, внутримышечного введений. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, вводят субъекту посредством внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, вводят субъекту посредством введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, вводят субъекту посредством внутримышечного введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы включают без ограничения водные жидкие дисперсии, самоэмульгирующиеся дисперсии, твердые растворы, липосомные дисперсии, аэрозоли, твердые лекарственные формы, порошки, составы немедленного высвобождения, составы контролируемого высвобождения, быстроплавкие составы, таблетки, капсулы, пилюли, составы замедленного высвобождения, составы пролонгированного высвобождения, составы импульсного высвобождения, составы в виде множества частиц (например, составы в виде наночастиц) и составы смешанного немедленного и контролируемого высвобождения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат носитель или материалы-носители, выбранные на основе совместимости с композицией, раскрытой в данном документе, и характеристик профиля высвобождения желаемой лекарственной формы. Иллюстративные материалы-носители включают, например, связующие вещества, суспендирующие средства, разрыхляющие средства, наполнители, поверхностно-активные вещества, солюбилизаторы, стабилизаторы, смазывающие средства, смачивающие средства, разбавители и т.п. Фармацевтически совместимые материалы-носители включают без ограничения аравийскую камедь, желатин, коллоидный диоксид кремния, глицерофосфат кальция, лактат кальция, мальтодекстрин, глицерин, силикат магния, поливинилпирролидон (PVP), холестерин, сложные эфиры холестерина, казеинат натрия, соевый лецитин, таурохолевую кислоту, фосфатидилхолин, хлорид натрия, трикальцийфосфат, дикалийфосфат, целлюлозу и конъюгаты целлюлозы, сахара, стеариоиллактат натрия, каррагинан, моноглицерид, диглицерид, прежелатинизированный крахмал и т.п. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980, и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

В некоторых случаях фармацевтическую композицию составляют в виде иммунолипосомы, которая содержит совокупность конъюгатов IL-2, прямо или опосредованно связанных с липидным бислоем липосом. Иллюстративные липиды включают без ограничения жирные кислоты; фосфолипиды; стеринны, такие как холестерин; сфинголипиды, такие как сфингомиелин; гликофинголипиды, такие как ганглиозиды, глобозиды и цереброзиды; амины поверхностно-активных веществ, такие как стеарил-, олеил- и линолеиламины. В некоторых случаях липид включает катионный липид. В некоторых случаях липид включает фосфолипид. Иллюстративные фосфолипиды включают без ограничения фосфатидную кислоту ("PA"), фосфатидилхолин ("PC"), фосфатидилглицерин ("PG"), фосфатидилэтаноламин ("PE"), фосфатидинозитол ("PI") и фосфатидилсерин ("PS"), сфингомиелин (включая сфингомиелин головного мозга), лецитин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, цереброзиды, диарахидоилфосфатидилхолин

("DAPC"), дидеканоил-L-альфа-фосфатидилхолин ("DDPC"), диелаидоилфосфатидилхолин ("DEPC"), дилауроилфосфатидилхолин ("DLPC"), дилинолеилфосфатидилхолин, димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), диолеилфосфатидилхолин ("DOPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолин ("POPC"), диарахидоилфосфатидилглицерин ("DAPG"), дидеканоил-L-альфа-фосфатидилглицерин ("DDPG"), диелаидоилфосфатидилглицерин ("DEPG"), дилауроилфосфатидилглицерин ("DLPG"), дилинолеилфосфатидилглицерин, димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG"), диолеилфосфатидилглицерин ("DOPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерин ("DSPG"), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилглицерин ("POPG"), диарахидоилфосфатидилэтанолламин ("DAPE"), дидеканоил-L-альфа-фосфатидилэтанолламин ("DDPE"), диелаидоилфосфатидилэтанолламин ("DEPE"), дилауроилфосфатидилэтанолламин ("DLPE"), дилинолеилфосфатидилэтанолламин, димиристоилфосфатидилэтанолламин ("DMPE"), диолеилфосфатидилэтанолламин ("DOPE"), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин ("DPPE"), дистеароилфосфатидилэтанолламин ("DSPPE"), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтанолламин ("POPE"), диарахидоилфосфатидилинозитол ("DAPI"), дидеканоил-L-альфа-фосфатидилинозитол ("DDPI"), диелаидоилфосфатидилинозитол ("DEPI"), дилауроилфосфатидилинозитол ("DLPI"), дилинолеилфосфатидилинозитол, димиристоилфосфатидилинозитол ("DMPI"), диолеилфосфатидилинозитол ("DOPPI"), дипальмитоилфосфатидилинозитол ("DPPI"), дистеароилфосфатидилинозитол ("DSPPI"), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилинозитол ("POPI"), диарахидоилфосфатидилсерин ("DAPS"), дидеканоил-L-альфа-фосфатидилсерин ("DDPS"), диелаидоилфосфатидилсерин ("DEPS"), дилауроилфосфатидилсерин ("DLPS"), дилинолеилфосфатидилсерин, димиристоилфосфатидилсерин ("DMPS"), диолеилфосфатидилсерин ("DOPS"), дипальмитоилфосфатидилсерин ("DPPS"), дистеароилфосфатидилсерин ("DSPS"), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилсерин ("POPS"), диарахидоилсфингомиелин, дидеканоилсфингомиелин, диелаидоилсфингомиелин, дилауроилсфингомиелин, дилинолеилсфингомиелин, димиристоилсфингомиелин, сфингомиелин, диолеилсфингомиелин, дипальмитоилсфингомиелин, дистеароилсфингомиелин и 1-пальмитоил-2-олеилсфингомиелин.

В некоторых случаях фармацевтические составы дополнительно содержат средства для доведения pH или буферные средства, которые включают кислоты, такие как уксусная, борная, лимонная, молочная, фосфорная и соляная кислоты, основания, такие как гидроксид натрия, фосфат натрия, борат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, лактат натрия и трис-гидрокси метиламинометан, и буферы, такие как цитрат/декстроза, бикарбонат натрия и хлорид аммония. Такие кислоты, основания и буферы включают в количестве, необходимом для поддержания pH композиции в приемлемом диапазоне.

В некоторых случаях фармацевтический состав содержит одну или несколько солей в количестве, необходимом для приведения осмоляльности композиции в приемлемый диапазон. Такие соли включают соли, содержащие катионы натрия, калия или аммония и анионы хлорида, цитрата, аскорбата, бората, фосфата, бикарбоната, сульфата, тиосульфата или бисульфита, подходящие соли включают хлорид натрия, хлорид калия, тиосульфат натрия, бисульфат натрия и сульфат аммония.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы включают без ограничения сахара, такие как трегалоза, сахароза, маннит, мальтоза, глюкоза, или соли, такие как фосфат калия, цитрат натрия, сульфат аммония, и/или другие средства, такие как гепарин, предназначенные для повышения растворимости и стабильности полипептидов *in vivo*.

В некоторых случаях фармацевтические составы дополнительно содержат разбавитель, который применяют для стабилизации соединений, поскольку они способны обеспечить более стабильную среду. Соли, растворенные в буферных растворах (которые также способны обеспечивать контроль или поддержание pH), применяют в качестве разбавителей в данной области техники, включая без ограничения забуференный фосфатом раствор хлорида натрия. В некоторых случаях разбавители увеличивают объем композиции для облегчения прессования или для создания достаточного объема для однородной смеси для заполнения капсул. Такие соединения могут включать, например, лактозу, крахмал, маннит, сорбит, декстрозу, микрокристаллическую целлюлозу, такую как Avicel®, двухосновный фосфат кальция, дикальция фосфат дигидрат, трикальция фосфат, кальция фосфат, безводную лактозу, высушенную распылением лактозу, предварительно желатинизированный крахмал, прессуемый сахар, такой как Di-Pac® (Amstar), маннит, гидроксипропилметилцеллюлозу, стеарат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, разбавители на основе сахарозы, кондитерский сахар, одноосновный моногидрат сульфата кальция, дигидрат сульфата кальция, тригидрат лактата кальция, декстраты, гидролизованные сухие вещества зерновых, амилозу, порошковую целлюлозу, карбонат кальция, глицин, каолин, маннит, хлорид натрия, инозит, бентонит и т.п. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, могут быть использованы в фармацевтических составах, содержащих гистидин, сорбит и полисорбат 80 или любую комбинацию, что дает стабильный состав, и могут вводиться нуждающимся в этом субъектам. В одном варианте осуществления конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, могут быть представлены в виде готового лекарственного продукта в подходящем контейнере, таком как флакон, в следующем виде: конъюгат IL-2 (от приблизительно 2 мг до приблизительно 10 мг); L-гистидин (от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2 мг); L-гистидина гидрохлорид (от приблизительно 1 мг

до приблизительно 2 мг); сорбит (от приблизительно 20 мг до приблизительно 80 мг) и полисорбат 80 (от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,2 мг); с достаточным количеством воды для инъекции для обеспечения жидкого состава, подходящего для применения в раскрываемых способах.

В некоторых случаях фармацевтические составы включают разрыхляющие средства или разрыхлители для облегчения распределения или разрыхления вещества. Термин "разрыхление" включает и растворение, и диспергирование лекарственной формы при контакте с желудочно-кишечным соком. Примеры разрыхляющих средств включают крахмал, например, натуральный крахмал, такой как кукурузный крахмал или картофельный крахмал, предварительно желатинизированный крахмал, такой как National 1551 или Amijel®, или натрий-крахмалгликолят, такой как Promogel® или Explotab®, целлюлозу, такую как продукт из древесины, кристаллическую метилцеллюлозу, например, Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel® PH105, Elcema® P100, Emcocel®, Vivacel®, Ming Tia® и Solka-Floc®, метилцеллюлозу, кроскармеллозу или сшитую целлюлозу, такую как сшитая натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Ac-Di-Sol®), сшитая карбоксиметилцеллюлоза или сшитая кроскармеллоза, сшитый крахмал, такой как натрия крахмалгликолят, сшитый полимер, такой как кросповидон, сшитый поливинилпирролидон, альгинат, такой как альгиновая кислота или соль альгиновой кислоты, такая как альгинат натрия, глину, такую как Veegum® HV (алюмосиликат магния), камедь, такую как агар, гуаровая камедь, камедь рожкового дерева, камедь карайи, пектин или трагакантовая камедь, натрия крахмалгликолят, бентонит, натуральную губку, поверхностно-активное вещество, смолу, такую как катионообменная смола, пульпу цитрусовых, натрия лаурилсульфат, натрия лаурилсульфат в комбинации с крахмалом и т.п.

В некоторых случаях фармацевтические составы включают наполнители, такие как лактоза, карбонат кальция, фосфат кальция, двухосновный фосфат кальция, сульфат кальция, микрорекристаллическая целлюлоза, порошок целлюлозы, декстроза, декстраты, декстран, крахмалы, предварительно желатинизированный крахмал, сахароза, ксилит, лактит, маннит, сорбит, хлорид натрия, полиэтиленгликоль и т.п.

Смазывающие средства и скользящие вещества также необязательно включают в фармацевтические составы, описанные в данном документе, для предупреждения, снижения или подавления адгезии или трения материалов. Иллюстративные смазывающие средства включают, например, стеариновую кислоту, гидроксид кальция, тальк, стеарилфумарат натрия, углеводород, такой как минеральное масло, или гидрогенизированное растительное масло, такое как гидрогенизированное соевое масло (Sterotex®), высшие жирные кислоты и их соли щелочных металлов и щелочноземельных металлов, таких как алюминия, кальция, магния, цинка, стеариновую кислоту, стеараты натрия, глицерин, тальк, воски, Stearowet®, борную кислоту, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, лейцин, полиэтиленгликоль (например, PEG-4000) или метоксиполиэтиленгликоль, такой как Carbowax™, олеат натрия, бензоат натрия, глицерилбенгенат, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат магния или натрия, коллоидный диоксид кремния, такой как Syloid™, Cab-O-Sil®, крахмал, такой как кукурузный крахмал, кремнийорганическое масло, поверхностно-активное вещество и т.п.

Пластификаторы включают соединения, используемые для размягчения микроинкапсулируемого материала или пленочных покрытий, чтобы сделать их менее хрупкими. Подходящие пластификаторы включают, например, полиэтиленгликоли, такие как PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 и PEG 800, стеариновую кислоту, пропиленгликоль, олеиновую кислоту, триэтилцеллюлозу и триацетин. Пластификаторы также могут функционировать в качестве диспергирующих средств или смачивающих средств.

Солубилизаторы включают такие соединения, как триацетин, триэтилцитрат, этилолеат, этилкаприлат, лаурилсульфат натрия, доккузат натрия, витамин Е TPGS, диметилацетамид, N-метилпирролидон, N-гидроксиэтилпирролидон, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилциклодекстрины, этанол, n-бутанол, изопропиловый спирт, холестерин, соли желчных кислот, полиэтиленгликоль 200-600, гликофурул, транскутол, пропиленгликоль, диметилизосорбид и т.п.

Стабилизаторы включают такие как любые антиоксидантные средства, буферы, кислоты, консерванты и т.п. Иллюстративные стабилизаторы включают гидрохлорид L-аргинина, трометамин, альбумин (человеческий), лимонную кислоту, бензиловый спирт, фенол, дигидрат динатрия бифосфата, пропиленгликоль, метакрезол или м-крезол, ацетат цинка, полисорбат-20 или Tween® 20, или трометамол.

Суспендирующие средства включают такие соединения, как поливинилпирролидон, например, поливинилпирролидон K12, поливинилпирролидон K17, поливинилпирролидон K25 или поливинилпирролидон K30, сополимер винилпирролидона и винилацетата (S630), полиэтиленгликоль, например, полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу от приблизительно 300 до приблизительно 6000, или от приблизительно 3350 до приблизительно 4000, или от приблизительно 7000 до приблизительно 5400, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлозы ацетат стеарат, полисорбат-80, гидроксипропилцеллюлоза, альгинат натрия, камеди, такие как, например, трагакантовая камедь и акациевая камедь, гуаровая камедь, ксантаны, в том числе ксантановая камедь, сахара, целлюлозные соединения, такие как, например, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза,

полисорбат-80, альгинат натрия, полиэтиоксилированный сорбитан монолаурат, полиэтиоксилированный сорбитан монолаурат, повидон и т.п.

Поверхностно-активные вещества включают такие соединения, как лаурилсульфат натрия, докузат натрия, Tween 60 или 80, триацетин, витамин E TPGS, сорбитанмоноолеат, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбаты, полаксомеры, соли желчных кислот, глицерилмоностеарат, сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, например, Pluronic® (BASF) и т.п. Дополнительные поверхностно-активные вещества включают полиоксиэтиленовые глицериды жирных кислот и растительных масел, например, полиоксиэтиленовое (60) гидрогенизированное касторовое масло, а также алкиловые эфиры и алкилфениловые эфиры полиоксиэтилена, например, октоксинол 10, октоксинол 40. Иногда поверхностно-активные вещества включают для повышения физической стабильности или для других целей.

Средства, повышающие вязкость, включают, например, метилцеллюлозу, кантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат стеарат, гидроксипропилметилцеллюлозы фталат, карбомер, поливиниловый спирт, альгинаты, акациевую камедь, хитозаны и их комбинации.

Смачивающие средства включают такие соединения, как олеиновая кислота, глицерилмоностеарат, сорбитан моноолеат, сорбитан монолаурат, триэтанолламин олеат, полиоксиэтилен сорбитан моноолеат, полиоксиэтилен сорбитан монолаурат, докузат натрия, олеат натрия, натрия лаурилсульфат, докузат натрия, триацетин, Tween 80, витамин E TPGS, соли аммония и т.п.

Терапевтические режимы.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции вводят для терапевтических применений. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят один раз в день, два раза в день, три раза в день или более. Фармацевтическую композицию вводят ежедневно, каждый день, через день, пять дней в неделю, один раз в неделю, через неделю, две недели в месяц, три недели в месяц, один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц или более. Фармацевтическую композицию вводят в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 2 лет, 3 лет или более.

В случае, когда состояние пациента действительно улучшается, по усмотрению врача введение композиции осуществляется непрерывно, альтернативно, дозу подлежащей введению композиции временно снижают или временно приостанавливают на определенный период времени (т.е. "перерыв в применении лекарственного средства"). В некоторых случаях продолжительность перерыва в применении лекарственного средства варьируется от 2 дней до 1 года, включая в качестве примера 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 12 дней, 15 дней, 20 дней, 28 дней, 35 дней, 50 дней, 70 дней, 100 дней, 120 дней, 150 дней, 180 дней, 200 дней, 250 дней, 280 дней, 300 дней, 320 дней, 350 дней или 365 дней. Снижение дозы во время перерыва в применении лекарственного средства составляет 10-100%, включая только в качестве примера 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель, один раз в 8 недель, один раз в 9 недель, один раз в 10 недель, один раз в 11 недель, один раз в 12 недель, один раз в 13 недель, один раз в 14 недель, один раз в 15 недель, один раз в 16 недель, один раз в 17 недель, один раз в 18 недель, один раз в 19 недель, один раз в 20 недель, один раз в 21 недель, один раз в 22 недели, один раз в 23 недели, один раз в 24 недели, один раз в 25 недель, один раз в 26 недель, один раз в 27 недель или один раз в 28 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 4 недели. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 5 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 6 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 7 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 8 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 9 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 10 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 11 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 12 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата PL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 13 недель. В

некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 14 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 15 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 16 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 17 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 18 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 19 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 20 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 21 неделю. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 22 недели. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 23 недели. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата ПЛ-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в 24 недели.

После улучшения состояния пациента при необходимости вводят поддерживающую дозу. Впоследствии дозировку или частоту введения, или и то и другое, можно уменьшать в зависимости от симптомов до уровня, на котором поддерживается улучшение состояния при заболевании, нарушении или состоянии.

В некоторых вариантах осуществления количество данного средства, которое соответствует такому количеству, варьируется в зависимости от таких факторов, как конкретное соединение, тяжесть заболевания, индивидуальные характеристики (например, вес) субъекта или хозяина, нуждающегося в лечении, но тем не менее обычно определяется способом, известным из уровня техники, в соответствии с конкретными обстоятельствами, относящимися к конкретному случаю, включая, например, конкретное подлежащее введению средство, путь введения и субъекта или хозяина, подлежащего лечению. В некоторых случаях требуемая доза обычно представлена в виде однократной дозы или разделенных доз, вводимых одновременно (или в течение короткого периода времени) или с соответствующими интервалами, например, в виде двух, трех, четырех или более субдоз в день.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение дозы конъюгата ПЛ-2 нуждающемуся в этом субъекту в диапазоне от 1 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 2 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 4 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 6 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 8 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 10 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 12 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 14 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 16 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 18 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 20 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 22 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 24 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 26 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 28 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 32 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 34 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 36 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 40 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 45 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 50 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 55 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 60 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 65 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса

тела субъекта, или от приблизительно 70 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 75 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 80 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 85 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 90 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 95 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 100 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 110 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 120 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 130 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 140 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 150 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 160 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 170 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 180 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, или от приблизительно 190 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта до приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта. Вышеупомянутые диапазоны являются лишь предположительными, поскольку количество переменных в отношении индивидуальной схемы лечения велико, и существенные отклонения от этих рекомендуемых значений не являются редкостью. Такие дозы изменяются в зависимости от ряда переменных, не ограничиваясь активностью применяемого соединения, заболеванием или патологическим состоянием, подлежащим лечению, способом введения, потребностями отдельного субъекта, тяжестью заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению, и мнением практикующего специалиста. В некоторых вариантах осуществления токсичность и терапевтическую эффективность таких схем терапии определяют с помощью стандартных фармацевтических процедур с использованием культур клеток или экспериментальных животных, включая без ограничения определение LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и выражается в виде соотношения между LD50 и ED50. Предпочтительными являются соединения, демонстрирующие высокие терапевтические индексы. Данные, полученные в анализах с применением культур клеток и в исследованиях на животных, применяются при составлении диапазона дозировки для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED50 с минимальной токсичностью. Дозировка варьируется в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение дозы конъюгата ПЛ-2 нуждающемуся в этом субъекту в дозе, составляющей приблизительно 1 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта или приблизительно 2 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 4 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 6 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 8 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 10 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 12 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 14 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 16 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 18 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 20 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 22 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 24 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 26 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 28 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 30 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 32 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 34 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 36 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 38 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 40 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 42 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 44 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 46 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 48 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 50 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 55 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 60 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 65 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 70 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 75 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 80 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 85 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 90 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 95 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 100 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 110 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 120 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 130 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 140 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 150 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 160 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 170 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 180 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 190 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 200 мкг конъюгата ПЛ-2 на кг веса тела субъекта.

югата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 100 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 110 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 120 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 130 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 140 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 150 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 160 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 170 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 180 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта, приблизительно 190 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта или приблизительно 200 мкг конъюгата IL-2 на кг веса тела субъекта. Вышеупомянутые диапазоны являются лишь предположительными, поскольку количество переменных в отношении индивидуальной схемы лечения велико, и существенные отклонения от этих рекомендуемых значений не являются редкостью. Такие дозы изменяются в зависимости от ряда переменных, не ограничиваясь активностью применяемого соединения, заболеванием или патологическим состоянием, подлежащим лечению, способом введения, потребностями отдельного субъекта, тяжестью заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению, и мнением практикующего специалиста. В некоторых вариантах осуществления токсичность и терапевтическую эффективность таких схем терапии определяют с помощью стандартных фармацевтических процедур с использованием культур клеток или экспериментальных животных, включая без ограничения определение LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции).

Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и выражается в виде соотношения между LD50 и ED50. Предпочтительными являются соединения, демонстрирующие высокие терапевтические индексы. Данные, полученные в анализах с применением культур клеток и в исследованиях на животных, применяются при составлении диапазона дозировки для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED50 с минимальной токсичностью. Дозировка варьируется в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Вышеупомянутые диапазоны являются лишь предположительными, поскольку количество переменных в отношении индивидуальной схемы лечения велико, и существенные отклонения от этих рекомендуемых значений не являются редкостью. Такие дозы изменяются в зависимости от ряда переменных, не ограничиваясь активностью применяемого соединения, заболеванием или патологическим состоянием, подлежащим лечению, способом введения, потребностями отдельного субъекта, тяжестью заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению, и мнением практикующего специалиста.

В некоторых вариантах осуществления токсичность и терапевтическую эффективность таких схем терапии определяют с помощью стандартных фармацевтических процедур с использованием культур клеток или экспериментальных животных, включая без ограничения определение LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и выражается в виде соотношения между LD50 и ED50. Предпочтительными являются соединения, демонстрирующие высокие терапевтические индексы. Данные, полученные в анализах с применением культур клеток и в исследованиях на животных, применяются при составлении диапазона дозировки для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED50 с минимальной токсичностью. Дозировка варьируется в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Наборы/изделие.

В данном документе в определенных вариантах осуществления раскрыты наборы и изделия для применения с одним или несколькими способами и композициями, описанными в данном документе. Такие наборы включают носитель, упаковку или контейнер, который разделен на части для размещения одного или нескольких контейнеров, таких как флаконы, пробирки и т.п., причем каждый контейнер содержит один из отдельных элементов, которые должны применяться в способе, описанном в данном документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и тестовые пробирки. В одном варианте осуществления контейнеры получают из различных материалов, таких как стекло или пластик.

В некоторых вариантах осуществления наборы содержат изделия, которые применимы для разработки средств для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат один или несколько из полипептидов цитокина (например, IL-2) или конъюгатов цитокина (например, IL-2), раскрываемых в данном документе, и необязательно одно или несколько фармацевтических вспомогательных веществ, описанных в данном документе, для облегчения доставки полипептидов цитокина (например, IL-2) или конъюгатов цитокина (например, IL-2). Такие наборы необязательно могут включать один или несколько вспомогательных компонентов, включающих индукторы передачи сигнала или модуляции T-клеточного рецептора (например, антитела к контрольным точкам иммунного ответа,

антитела к CD3/CD28, основные комплексы гистосовместимости (МНС) и т.п.), или альтернативные цитокины, или агонисты цитокиновых рецепторов. Такие наборы дополнительно необязательно включают идентифицирующее описание или этикетку, или инструкции, относящиеся к их применению в способах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат одну или несколько последовательностей полинуклеиновых кислот, кодирующих конъюгаты IL-2, раскрываемые в данном документе, активатор CD4⁺ хелперной клетки, CD8⁺ эффекторной наивной и клетки памяти, натуральной киллерной (NK) клетки или натуральной киллерной Т-клетки (НКТ) и/или их фармацевтическую композицию.

Наборы и изделия для лечения пролиферативных и инфекционных заболеваний.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие выделенный и модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в положении в полипептиде, что снижает степень связывания между модифицированным полипептидом IL-2 и α -рецептором интерлейкина 2 (IL-2R α), но сохраняет значительную степень связывания с сигнальным комплексом $\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$) с образованием комплекса IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления снижение связывания с IL-2R α предусматривает уменьшение аффинности связывания на приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления снижение связывания с IL-2R α предусматривает уменьшение в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или больше по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие выделенный и модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, где выделенный и модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$, и где различие между эффективностью передачи сигнала первого рецептора и эффективностью передачи сигнала второго рецептора является менее чем 10-кратным. В некоторых вариантах осуществления различие в эффективности рецепторной передачи сигнала является менее чем 5-кратным, менее чем 4-кратным, менее чем 3-кратным, менее чем 2-кратным или менее чем 1-кратным.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в положении в полипептиде, что снижает степень связывания между модифицированным полипептидом IL-2 и α -рецептором интерлейкина 2 (IL-2R α), но сохраняет значительную степень связывания с сигнальным комплексом $\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$) с образованием комплекса IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, где выделенный и модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к комплексу передачи сигнала IL-2 $\alpha\beta\gamma$, и где различие между эффективностью в передаче сигнала первого рецептора и эффективностью в передаче сигнала второго рецептора является менее чем 10-кратной. В некоторых вариантах осуществления различие в эффективности рецепторной передачи сигнала является менее чем 5-кратным, менее чем 4-кратным, менее чем 3-кратным, менее чем 2-кратным или менее чем 1-кратным.

Наборы и изделия для лечения аутоиммунных заболеваний.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие выделенный и модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в положении в полипептиде, что снижает эффективность рецепторной передачи сигнала к $\beta\gamma$ -рецептору интерлейкина 2 (IL-2R $\beta\gamma$) или снижает рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β , но сохраняет значительную активацию $\alpha\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), при этом сниженную эффективность рецепторной передачи сигнала сравнивают с эффективностью рецепторной передачи сигнала между полипептидом IL-2 дикого типа и IL-2R $\beta\gamma$, и при этом рекрутинг сравнивают с рекрутингом субъединицы IL-2R γ полипептидом IL-2 дикого типа.

В данном документе в некоторых вариантах осуществления раскрываются наборы, содержащие выделенный и модифицированный полипептид интерлейкина 2 (IL-2), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в положении в полипептиде, что повышает рекрутинг субъединицы IL-2R α в полипептид IL-2, что приводит к активации $\alpha\beta\gamma$ -рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), при этом повышение рекрутинга сравнивают с рекрутингом субъединицы IL-2R α полипептидом IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 с понижением эффек-

тивности рецепторной передачи сигнала к IL-2R $\beta\gamma$ способен обеспечивать размножение CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Treg). В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент ухудшает или блокирует эффективность рецепторной передачи сигнала IL-2 с IL-2R $\beta\gamma$ или снижает рекрутинг субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β . В некоторых вариантах осуществления пролиферация CD4⁺ Treg-клеток комплексом модифицированный IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ эквивалентна или превышает таковую у полипептида IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ индуцирует пролиферацию CD4⁺ Treg-клеток в популяцию, что достаточно для модуляции течения заболевания в животной модели. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 проявляет эффективность в передаче сигнала первого рецептора к IL-2R $\beta\gamma$ и эффективность в передаче сигнала второго рецептора к IL-2R $\alpha\beta\gamma$, при этом эффективность в передаче сигнала первого рецептора выше в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз или меньше, чем эффективность в передаче сигнала второго рецептора. В некоторых вариантах осуществления эффективность в передаче сигнала первого рецептора модифицированного полипептида IL-2 ниже, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа к IL-2R $\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления эффективность в передаче сигнала второго рецептора модифицированного полипептида IL-2 ниже, чем эффективность рецепторной передачи сигнала полипептида IL-2 дикого типа к IL-2R $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 дополнительно обеспечивает повышение рекрутинга субъединицы IL-2R α в полипептид IL-2, что приводит к активации аРу-рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), где повышение рекрутинга сравнивают с рекрутингом субъединицы IL-2R α полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 дополнительно обеспечивает снижение рекрутинга субъединицы IL-2R γ в комплекс IL-2/IL-2R β , при этом сниженный рекрутинг сравнивают с рекрутингом субъединицы IL-2R β и/или субъединицы IL-2R γ полипептидом IL-2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 и T113, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 и Q126, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из K8, K9 и H16, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из Q22, N26, N88 и Q126, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из E15, D20, D84 и E95, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из L12, L19 и M23, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления положение по меньшей мере одной не природной аминокислоты выбрано из Q22 и N26, где нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

Наборы и изделия в целом.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна не природная аминокислота представляет собой аналог лизина, содержит ароматическую боковую цепь, содержит азидогруппу, содержит алкиновую группу или содержит альдегидную или кетонную группу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна не природная аминокислота не содержит ароматическую боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна не природная аминокислота включает N6-(2-азидоэтокси)карбонил-L-лизин (AzK; химическая структура которого показана в виде соединения 90 на фиг. 3C), N6-(пропаргилокси)карбонил-L-лизин (PraK; химическая структура которого показана в виде соединения 112 на фиг. 3C), BCN-L-лизин, норборненилизин, TCO-лизин, метилтетразинлизин, аллиллок-

сикарбониллизин, 2-амино-8-оксононановую кислоту, 2-амино-8-оксооктановую кислоту, п-ацетил-L-фенилаланин, п-азидометил-L-фенилаланин (pAMF), п-йод-L-фенилаланин, м-ацетилфенилаланин, 2-амино-8-оксононановую кислоту, п-пропаргиллоксифенилаланин, п-пропаргил-фенилаланин, 3-метилфенилаланин, L-дофу, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, О-аллилтирозин, О-метил-L-тирозин, О-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, фосфонотиозин, три-О-ацетил-GlcNAc-серин, L-фосфосерин, фосфоносерин, L-3-(2-нафтил)аланин, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-окопропил)амино)этил)селанин)пропановую кислоту, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановую кислоту или селеноцистеин. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота включает N6-(2-азидоэтокси)карбонил-L-лизин (AzK; химическая структура которого показана в виде соединения 90 на фиг. 3С) или N6-(пропаргиллокси)карбонил-L-лизин (PraK; химическая структура которого показана в виде соединения 112 на фиг. 3С). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота включает N6-(2-азидоэтокси)карбонил-L-лизин (AzK; химическая структура которого показана в виде соединения 90 на фиг. 3С). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота включает N6-(пропаргиллокси)карбонил-L-лизин (PraK; химическая структура которого показана в виде соединения 112 на фиг. 3С).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота содержит алкин, которому обеспечивают возможность вступления в реакцию с конъюгирующим фрагментом, который включает водорастворимый полимер, включающий полиэтиленгликоль (PEG), поли(пропиленгликоль) (PPG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает молекулу PEG.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2 содержит конъюгирующий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент включает водорастворимый полимер, липид, белок и/или пептид. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает полиэтиленгликоль (PEG), поли(пропиленгликоль) (PPG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер включает молекулу PEG.

В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит молекулу PEG, которая связана с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови PEG, размер которого меньше конъюгирующего фрагмента. В некоторых случаях конъюгирующий фрагмент содержит молекулу PEG, которая связана с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови PEG, размер которого превышает размер конъюгирующего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В некоторых вариантах осуществления молекула PEG представляет собой линейный PEG. В некоторых вариантах осуществления молекула PEG представляет собой разветвленный PEG. В некоторых вариантах осуществления масса PEG составляет от приблизительно 2000 до 50000 дальтон (Да). В некоторых вариантах осуществления PEG имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 5000 Да, 10000 Да, 15000 Да, 20000 Да, 25000 Да, 30000 Да, 35000 Да, 40000 Да, 45000 Да или 50000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 5000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 10000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 15000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 20000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 25000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 30000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 35000 Да. В некоторых случаях масса PEG состав-

ляет 40000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 45000 Да. В некоторых случаях масса PEG составляет 50000 Да.

Предусмотренные в данном документе изделия содержат упаковочные материалы. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают без ограничения блистерные упаковки, бутылки, пробирки, пакеты, контейнеры, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранного состава и предполагаемого способа введения и лечения.

Например, контейнер(ы) включает(-ют) один или несколько фрагментов полипептидов IL-2, содержащих A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 или T133 с положениями остатков, соответствующими 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 37, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 60, 67, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 109 и 88, 110, 111, 112, 113, 116, 119, 120, 123, 125, 126, 127, 130, 131, 132 и 133, представленным в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий T37 с положениями остатков, соответствующими положениям 9, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 29, 53, 55, 57, 60, 67, 71, 74, 75, 76, 99, 100, 101, 102, 10 116, 119, 120, 123, 125, 131, 132 и 133, представленным в SEQ ID NO: 1, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 β γ или IL-2 α β γ . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R β γ , при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R β γ , при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид IL-2, содержащий мутацию в остатке K8, соответствующем положению 8 в SEQ ID NO: 3, содержит конъюгирующий фрагмент, содержащий PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 2000-50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 15000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 20000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 25000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на

осуществления молекулярная масса составляет 30000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 35000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 45000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 55000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса составляет 60000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG определяет, по меньшей мере частично, *in vivo* период полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2. В некоторых случаях PEG связан с более длительным *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG меньшего размера. В некоторых случаях PEG связан с более коротким *in vivo* периодом полужизни в плазме крови модифицированного полипептида IL-2 по сравнению с *in vivo* периодом полужизни в плазме крови при PEG большего размера. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на эффективность рецепторной передачи сигнала модифицированного полипептида IL-2 к комплексам передачи сигнала IL-2 $\beta\gamma$ или IL-2 $\alpha\beta\gamma$. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет или оказывает минимальное воздействие на требуемое сниженное связывание модифицированного полипептида IL-2 с IL-2R α или поддерживаемое связывание с комплексом передачи сигнала IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α . В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса PEG не влияет на образование комплекса модифицированный полипептид IL-2/IL-2R $\beta\gamma$, при этом сниженное связывание с IL-2R α сравнивают со связыванием полипептида IL-2 дикого типа и IL-2R α .

Набор обычно включает этикетки с перечнем содержимого и/или инструкциями по применению, а также листки-вкладыши с инструкциями по применению. Также обычно включается набор инструкций.

В одном варианте осуществления этикетка находится в на контейнере или связана с ним. В одном варианте осуществления этикетка находится на контейнере, когда буквы, числа или другие символы, образующие этикетку, прикреплены, отформованы или вытравлены на самом контейнере, при этом этикетка связана с контейнером, когда она находится внутри приспособления или держателя, который также удерживает контейнер, например, в виде листка-вкладыша. В одном варианте осуществления этикетка применяется для обозначения того, что содержимое должно применяться для конкретного терапевтического применения. Этикетка также указывает направления для применения содержимого, такие как в описанных в данном документе способах.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которые содержат одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих соединение, предусмотренное в данном документе. Упаковка, например, содержит металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. В одном варианте осуществления упаковка или дозирующее устройство сопровождается инструкциями по введению. В одном варианте осуществления упаковка или дозатор также сопровождается уведомлением, связанным с контейнером, по форме, предписанной государственным агентством, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов, причем уведомление отражает одобрение агентством формы лекарственного средства для введения человеку или в ветеринарии. Такое уведомление, например, представляет собой этикетку, одобренную Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами США для лекарственных средств, или листок-вкладыш одобренного продукта. В одном варианте осуществления композиции, содержащие соединение, предусмотренное в данном документе, составленные в совместимом фармацевтическом носителе, также получают, помещают в соответствующий контейнер и маркируют для лечения указанного состояния.

Определенная терминология.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит заявленный объект изобретения. Следует понимать, что подробное описание является лишь иллюстративным и пояснительным и не ограничивает какой-либо заявленный объект изобретения. В данной заявке применение единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. Следует отметить, что применяемые в данном описании формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекстом явно не предписывается иное. В данной заявке применение "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, применение термина "включая", а также других форм, таких как "включать", "включает" и "включенный", не является ограничивающим.

Хотя различные признаки настоящего изобретения могут быть описаны в контексте одного варианта осуществления, признаки также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей комбинации. Наоборот, несмотря на то, что настоящее изобретение может быть описано в данном документе в контексте отдельных вариантов осуществления для ясности, настоящее изобретение также может быть реализовано в одном варианте осуществления.

Ссылка в настоящем описании на "некоторые варианты осуществления", "вариант осуществления", "один вариант осуществления" или "другие варианты осуществления" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантами осуществления, включены по меньшей мере в некоторые варианты осуществления, но не обязательно во все варианты осуществления настоящего изобретения.

Применяемые в данном документе, диапазоны и количества могут быть выражены как "приблизительно" конкретное значение или диапазон. "Приблизительно" также включает точное количество. Следовательно "приблизительно 5 мкл" означает "приблизительно 5 мкл", а также "5 мкл." Как правило, выражение "приблизительно" включает количество, которое, как ожидается, будет находиться в пределах экспериментальной погрешности, например в пределах 15%, 10% или 5%.

Применяемые в данном документе заголовки разделов служат только в организационных целях и не должны пониматься как ограничивающие описываемый объект изобретения.

Применяемые в данном документе термины "индивидуум(индивидуумы)", "субъект(субъекты)" и "пациент(пациенты)" означают любое млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является отличным от человека. Ни один из терминов не требует ситуаций, характеризующихся наблюдением (например, постоянным или периодическим) медицинского работника (например, врача, дипломированной медсестры, практикующей медсестры, фельдшера, санитаря или работника хосписа), или не ограничивается ими.

Используемое в данном документе выражение "значительный" или "в значительной степени" применительно к аффинности связывания означает изменение аффинности связывания цитокина (например, полипептида IL-2), достаточное для воздействия на связывание цитокина (например, полипептида IL-2) с целевым рецептором. В некоторых случаях термин относится к изменению на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более. В некоторых случаях термин означает изменение в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз или более.

В некоторых случаях выражение "значительный" или "в значительной степени" применительно к активацию одной или нескольких популяций клеток посредством сигнального комплекса цитокина означает изменение, достаточное для активации популяции клеток. В некоторых случаях изменение для активации популяции клеток измеряется как эффективность рецепторной передачи сигнала. В таких случаях может быть предусмотрено значение EC50. В других случаях может быть предусмотрено значение ED50. В дополнительных случаях может быть предусмотрена концентрация или дозировка цитокина.

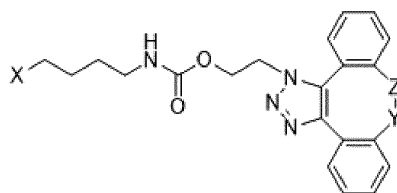
Используемый в данном документе термин "эффективность" относится к количеству цитокина (например, полипептида IL-2), необходимому для достижения целевого эффекта. В некоторых случаях термин "эффективность" относится к количеству цитокина (например, полипептида IL-2), необходимому для активации целевого рецептора цитокина (например, рецептора IL-2). В других случаях термин "эффективность" относится к количеству цитокина (например, полипептида IL-2), необходимому для активации целевой популяции клеток. В некоторых случаях эффективность измеряется как ED50 (эффективная доза 50) или доза, необходимая для достижения 50% от максимального эффекта. В других случаях эффективность измеряется как EC50 (эффективная концентрация 50) или доза, необходимая для достижения целевого эффекта у 50% популяции.

Используемый в данном документе термин "конъюгат IL-2" представляет собой полипептид IL-2, присоединенный (например, посредством линкера) к конъюгирующему фрагменту, например, содержащему группу PEG; конъюгат IL-2 может необязательно находиться в форме фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата. Как подробно описано в другом месте данного документа, полипептид IL-2 может содержать неприродную аминокислоту, которая может служить в качестве сайта присоединения к конъюгирующему фрагменту.

Пронумерованные варианты осуществления.

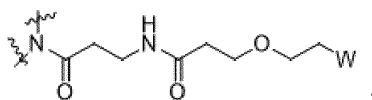
В настоящем изобретении включены следующие неограничивающие пронумерованные варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (I):

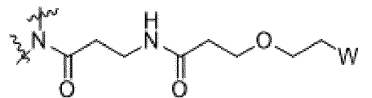


формула (I);

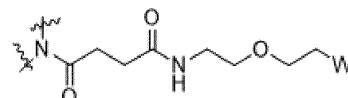
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



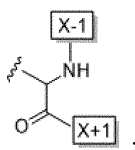
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой

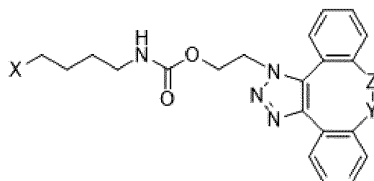


Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и
X имеет структуру



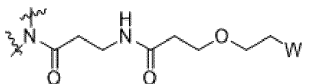
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 1.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (I):

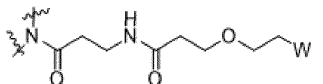


формула (I);

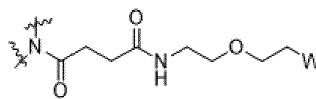
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



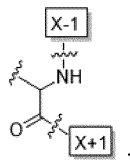
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой



Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой



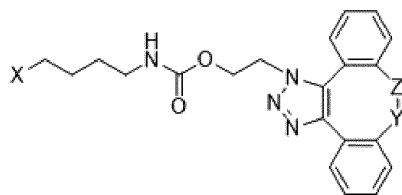
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и
X имеет структуру



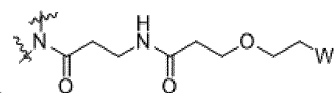
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

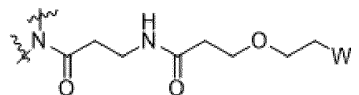
Вариант осуществления 2. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен

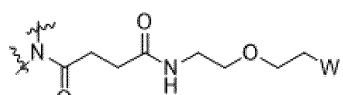
структурой формулы (I):

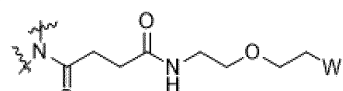


формула (I);

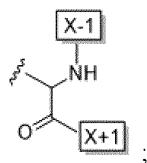
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой  ;

Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой  ;

Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой  ; или

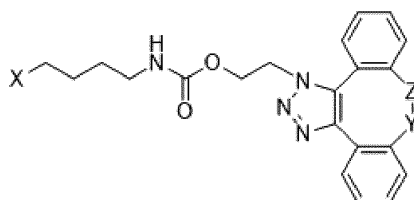
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой  ;
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа;

X имеет структуру

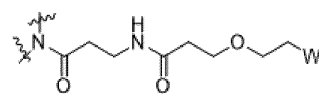


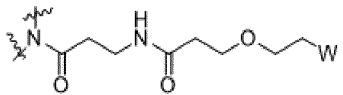
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 2.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (I):

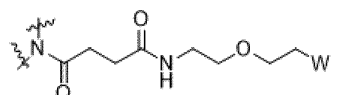


формула (I);

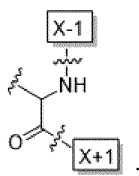
где Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой  ;

Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой  ;

Z представляет собой CH₂, и Y представляет собой  ; или

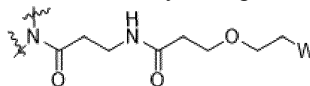
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой  ;
W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа;

X имеет структуру



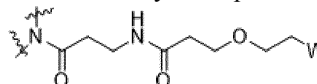
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 3. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где Z



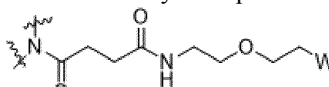
представляет собой CH₂, и Y представляет собой

Вариант осуществления 4. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где



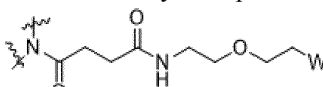
Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой

Вариант осуществления 5. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где Z



представляет собой CH₂, и Y представляет собой

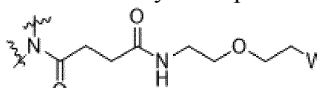
Вариант осуществления 6. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где Z



представляет собой CH₂, и Y представляет собой

и W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа.

Вариант осуществления 7. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где



Y представляет собой CH₂, и Z представляет собой

Вариант осуществления 8. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-2.1, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из 5 кДа, 10 кДа, 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа или 50 кДа.

Вариант осуществления 9. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-1.1, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 10. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-1.1, где группа PEG имеет среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 11. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-1.1, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132.

Вариант осуществления 12. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 11, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130.

Вариант осуществления 13. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 12, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130.

Вариант осуществления 14. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 13, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8.

Вариант осуществления 15. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 13, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15.

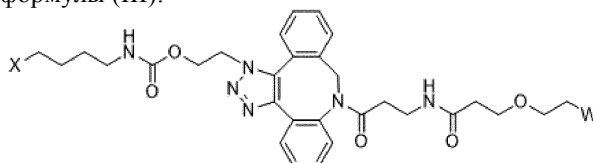
Вариант осуществления 16. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 13, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18.

Вариант осуществления 17. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 13, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19.

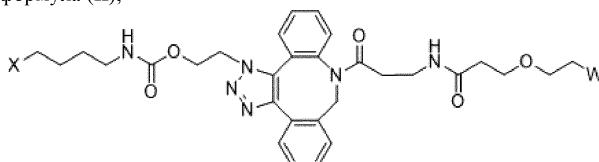
структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125.

Вариант осуществления 44. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 30, где положение структуры формулы (I) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

Вариант осуществления 45. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):



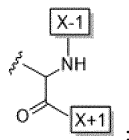
формула (II);



формула (III);

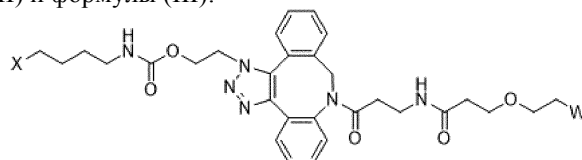
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

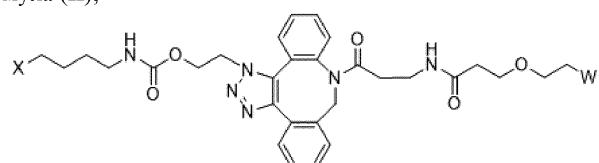


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 45.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):



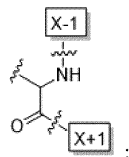
формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

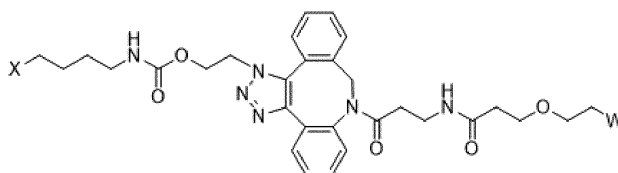


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 46. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 45-45.1, где [AzK_PEG] представляет собой смесь формулы (II) и формулы (III), или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 47. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 45-45.1, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II):



формула (II);

или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 48. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 47, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48.

Вариант осуществления 49. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 47, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 50. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 49, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 51. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 50, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 52. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 50, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 53. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 47, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 199-213.

Вариант осуществления 54. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 53, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 55. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 54, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 56. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 55, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 57. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 55, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 58. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 45, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35 или 200.

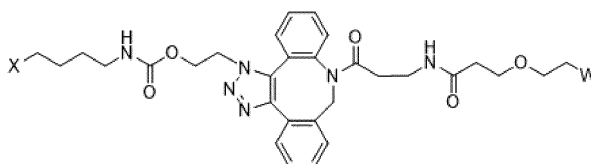
Вариант осуществления 59. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 58, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 60. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 59, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 61. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 60, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 62. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 60, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 63. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 45, где [AzK_PEG] имеет структуру формулы (II),



формула (III);

или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 64. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 63, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48.

Вариант осуществления 65. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 64, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 66. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 65, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 67. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 66, где W представля-

ет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 68. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 66, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 69. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 45, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 199-213.

Вариант осуществления 70. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 69, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 71. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 70, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 72. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 71, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 73. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 71, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 74. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-73, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG.

Вариант осуществления 75. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-73, где W представляет собой линейную группу PEG.

Вариант осуществления 76. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-73, где W представляет собой разветвленную группу PEG.

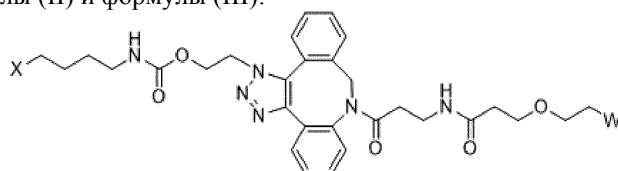
Вариант осуществления 77. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-73, где W представляет собой группу метокси-PEG.

Вариант осуществления 78. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 77, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной.

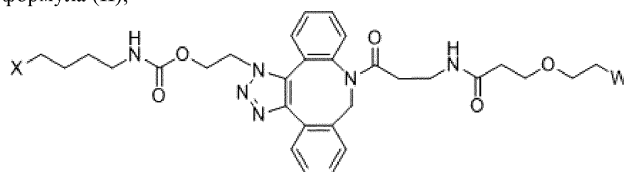
Вариант осуществления 79. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 78, где группа метокси-PEG является линейной.

Вариант осуществления 80. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 78, где группа метокси-PEG является разветвленной.

Вариант осуществления 81. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):

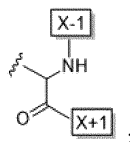


формула (II);



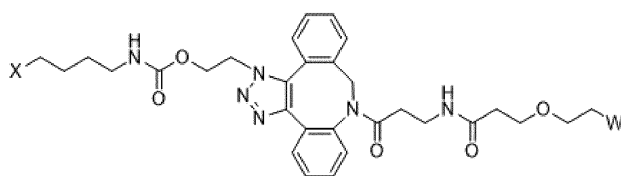
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру

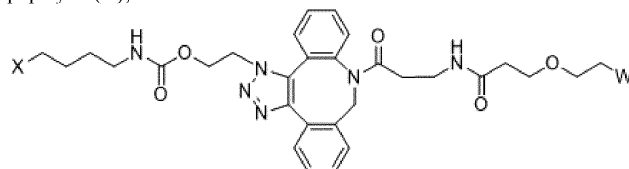


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 81.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III):

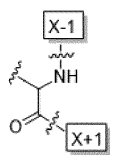


формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



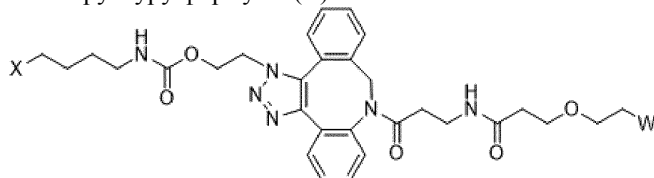
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 82. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 81-81.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63.

Вариант осуществления 83. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 81-81.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228.

Вариант осуществления 84. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 81-81.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215.

Вариант осуществления 85. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 81-81.1, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (II):



формула (II);

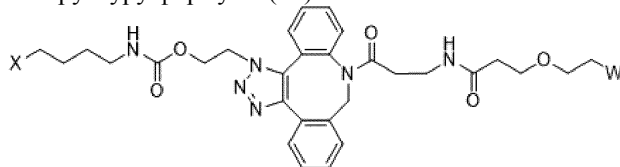
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 86. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 85, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63.

Вариант осуществления 87. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 85, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228.

Вариант осуществления 88. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 85, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215.

Вариант осуществления 89. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 81-81.1, где [AzK_PEG50kDa] имеет структуру формулы (III):



формула (III);

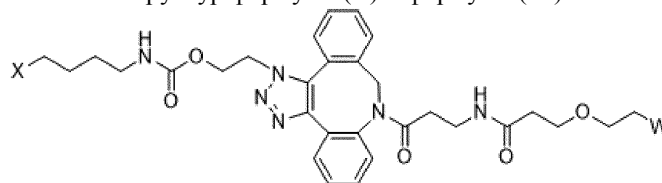
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 90. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 89, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63.

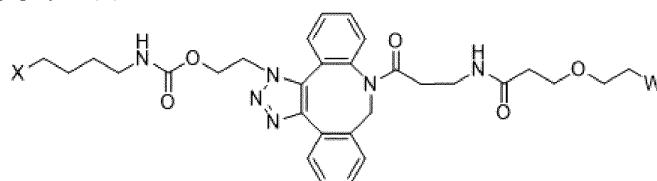
Вариант осуществления 91. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 89, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 214-228.

Вариант осуществления 92. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 89, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50 или 215.

Вариант осуществления 93. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

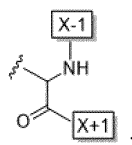


формула (II);



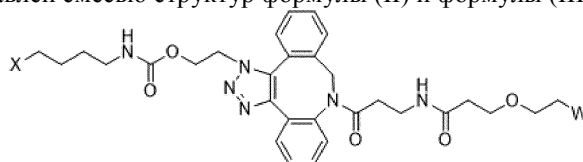
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

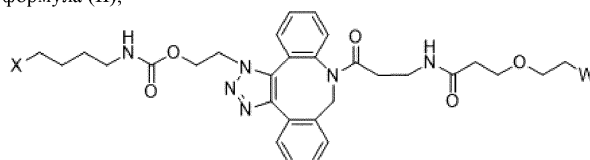


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 93.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (II) или формулы (III) или представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

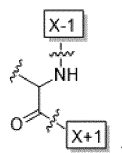


формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

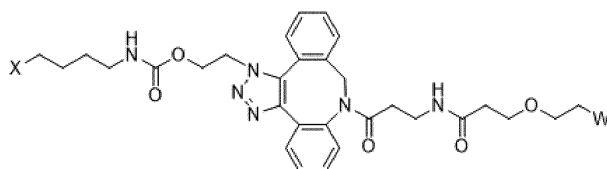
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 94. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78.

Вариант осуществления 95. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243.

Вариант осуществления 96. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230.

Вариант осуществления 97. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (II):



формула (II);

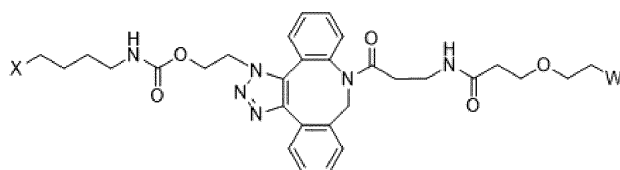
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 98. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 97, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78.

Вариант осуществления 99. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 97, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243.

Вариант осуществления 100. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 97, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230.

Вариант осуществления 101. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где [AzK_PEG30kDa] имеет структуру формулы (III):



формула (III);

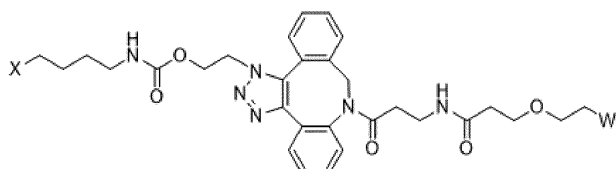
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 102. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 101, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78.

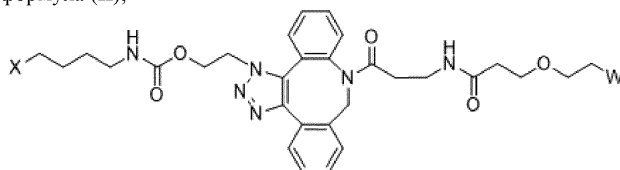
Вариант осуществления 103. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 101, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 229-243.

Вариант осуществления 104. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 101, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или 230.

Вариант осуществления 105. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):



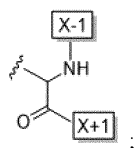
формула (II);



формула (III);

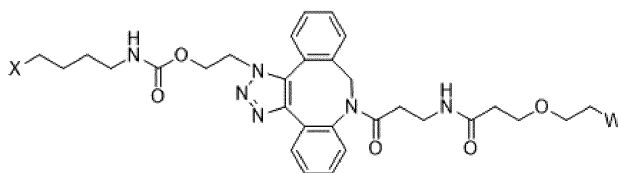
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

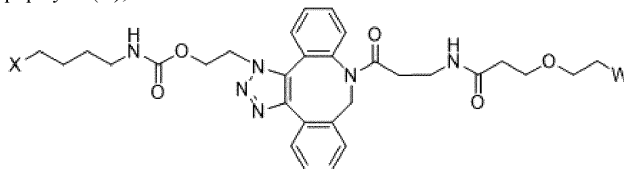


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 105.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-48 и 199-213, где [AzK_PEG] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):



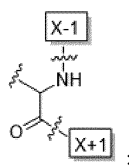
формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 106. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-105.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

Вариант осуществления 107. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-105.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

Вариант осуществления 108. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-105.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 109. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-109, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG.

Вариант осуществления 110. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-109, где W представляет собой линейную группу PEG.

Вариант осуществления 111. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-109, где W представляет собой разветвленную группу PEG.

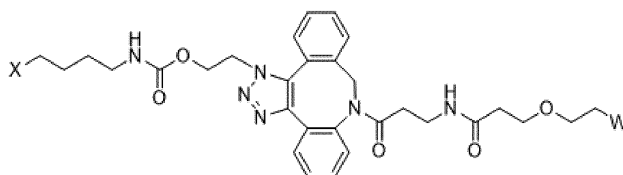
Вариант осуществления 112. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 105-109, где W представляет собой группу метокси-PEG.

Вариант осуществления 113. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 112, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной.

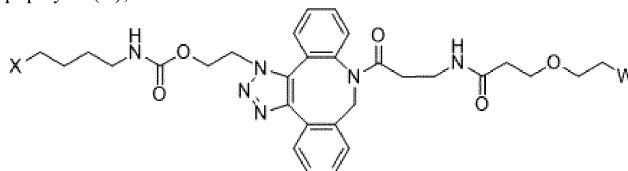
Вариант осуществления 114. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 113, где группа метокси-PEG является линейной.

Вариант осуществления 115. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 113, где группа метокси-PEG является разветвленной.

Вариант осуществления 116. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

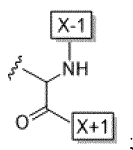


формула (II);



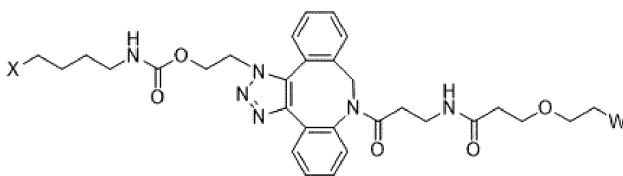
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру

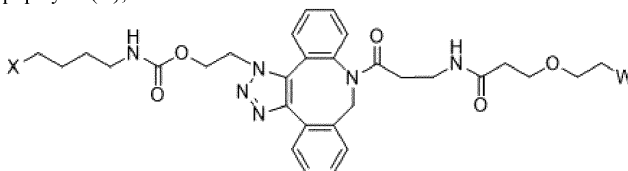


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 116.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-63 и 214-228, где [AzK_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

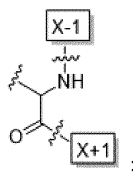


формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

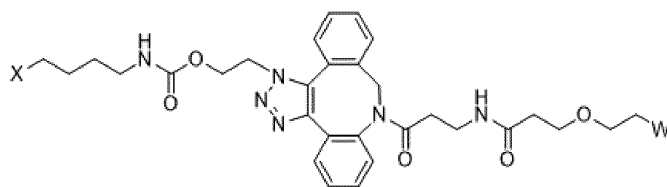
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 117. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 116-116.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

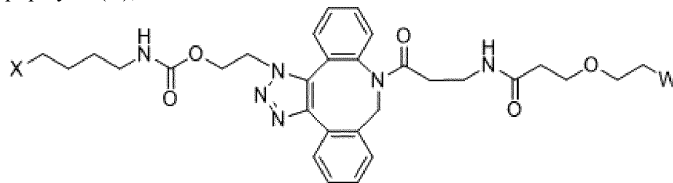
Вариант осуществления 118. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 116-116.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

Вариант осуществления 119. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 116-116.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 120. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

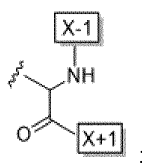


формула (II);



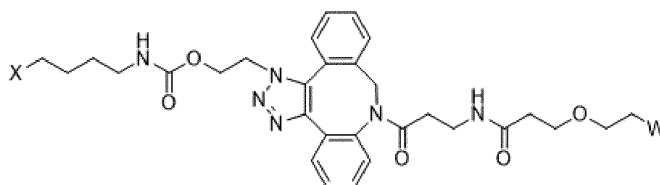
формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

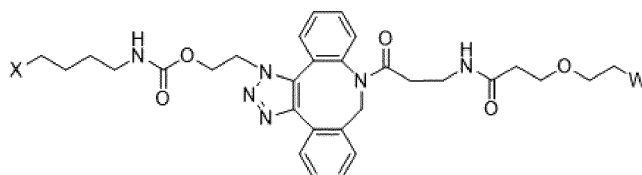


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 120.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 64-78 и 229-243, где [AzK_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (II) и формулы (III):

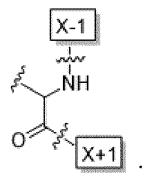


формула (II);



формула (III);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

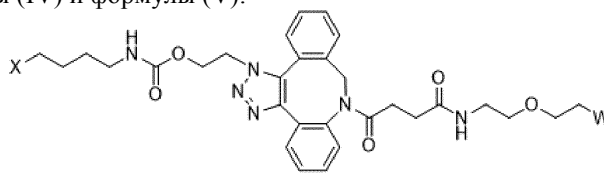
Вариант осуществления 121. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 120-120.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

Вариант осуществления 122. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 120-120.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

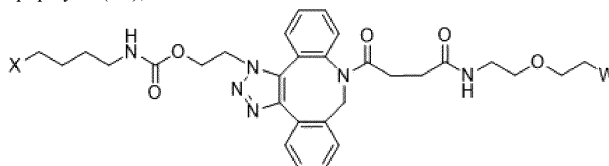
Вариант осуществления 123. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 120-120.1, где соотношение количества структуры формулы (II) и количества структуры формулы (III), содержащихся в общем количестве [AzK_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 124. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под

любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V):



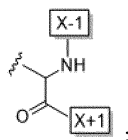
формула (IV);



формула (V);

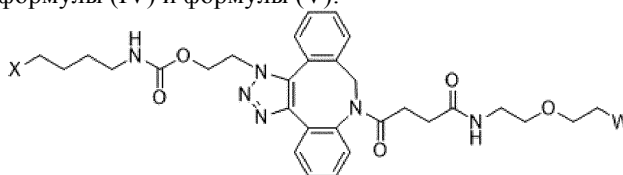
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

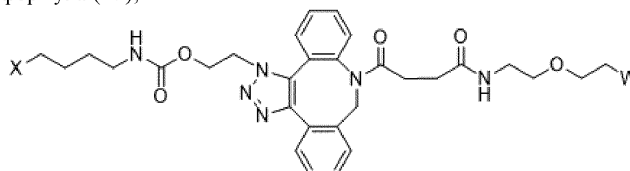


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 124.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V):



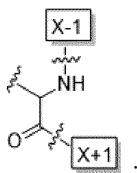
формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

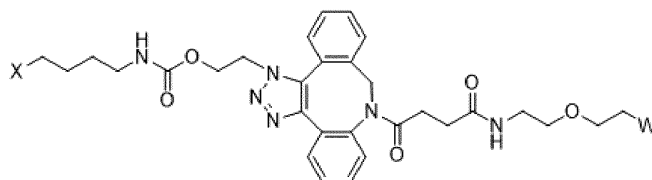


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 125. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-124.1, где [AzK_L1_PEG] представляет собой смесь формулы (IV) и формулы (V), или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 126. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-124.1, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (IV):



формула (IV);

или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 127. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 126, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 109-123.

Вариант осуществления 128. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 127, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 129. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 128, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 130. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 129, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 131. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 129, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 132. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 126, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155 или 110.

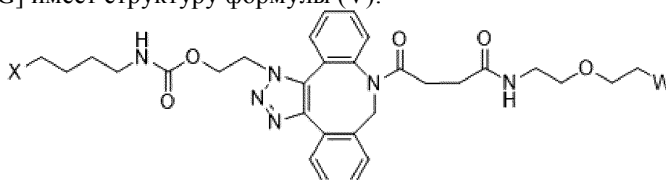
Вариант осуществления 133. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 132, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 134. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 133, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 135. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 134, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 136. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 134, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 137. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-124.1, где [AzK_L1_PEG] имеет структуру формулы (V):



формула (V);

или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 138. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 137, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 109-123.

Вариант осуществления 139. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 138, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 140. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 139, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 141. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 140, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 142. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 140, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 143. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 137, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155 или ПО.

Вариант осуществления 144. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 143, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 кДа.

Вариант осуществления 145. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 144, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 50 кДа и 30 кДа.

Вариант осуществления 146. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 145, где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа.

Вариант осуществления 147. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 145, где W представ-

ляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Вариант осуществления 148. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-147, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG.

Вариант осуществления 149. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-147, где W представляет собой линейную группу PEG.

Вариант осуществления 150. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-147, где W представляет собой разветвленную группу PEG.

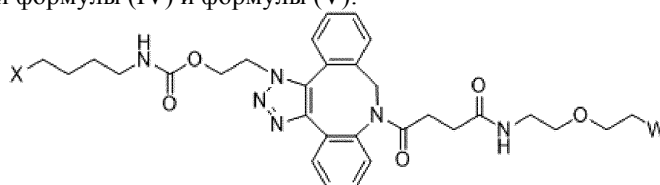
Вариант осуществления 151. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 124-147, где W представляет собой группу метокси-PEG.

Вариант осуществления 152. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 151, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной.

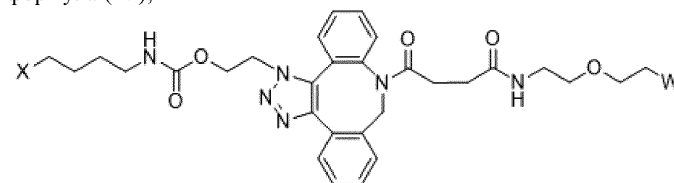
Вариант осуществления 153. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 152, где группа метокси-PEG является линейной.

Вариант осуществления 154. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 152, где группа метокси-PEG является разветвленной.

Вариант осуществления 155. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183 и 124-138, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V):

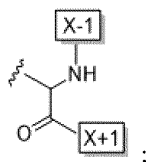


формула (IV);



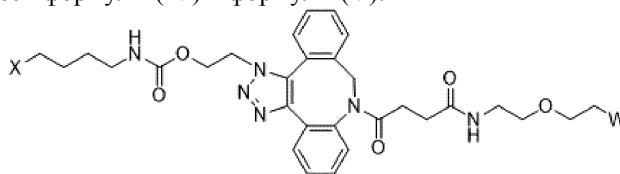
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру

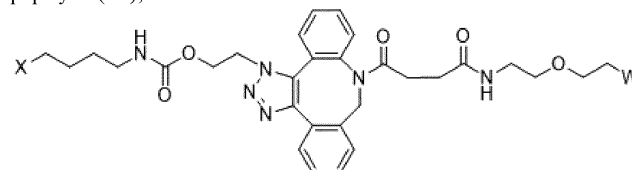


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 155.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183 и 124-138, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V):

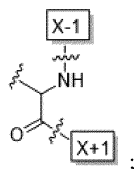


формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



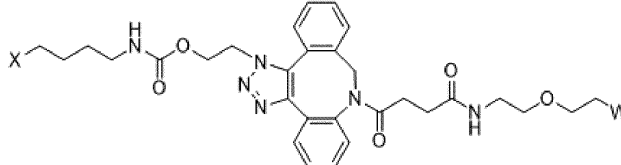
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 156. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183.

Вариант осуществления 157. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138.

Вариант осуществления 158. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125.

Вариант осуществления 159. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (IV):



формула (IV);

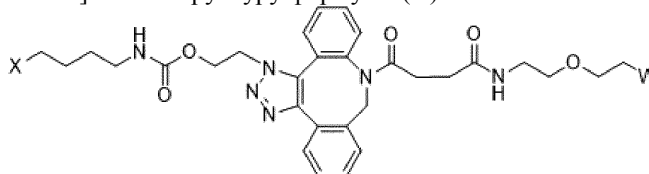
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 160. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 159, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183.

Вариант осуществления 161. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 159, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138.

Вариант осуществления 162. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 159, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125.

Вариант осуществления 163. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где [AzK_L1_PEG50kDa] имеет структуру формулы (V):



формула (V);

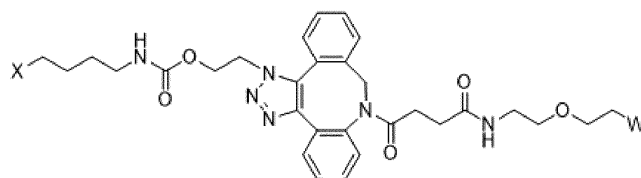
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 164. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 163, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183.

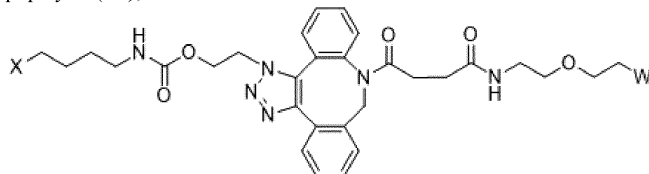
Вариант осуществления 165. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 163, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 124-138.

Вариант осуществления 166. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 163, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170 или 125.

Вариант осуществления 167. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

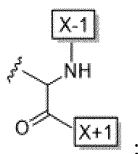


формула (IV);



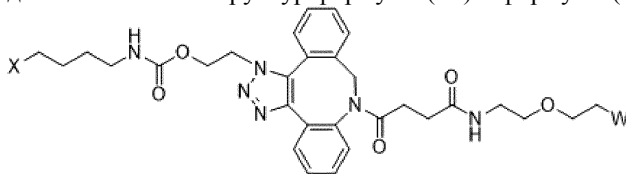
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

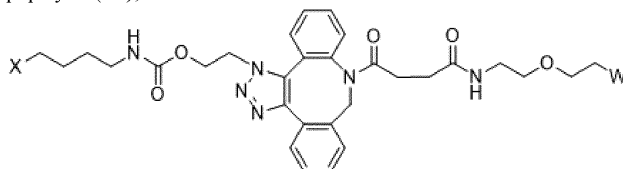


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 167.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

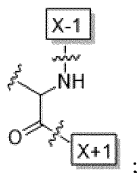


формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



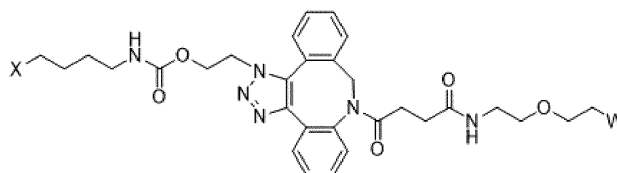
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 168. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198.

Вариант осуществления 169. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153.

Вариант осуществления 170. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140.

Вариант осуществления 171. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (IV):



формула (IV);

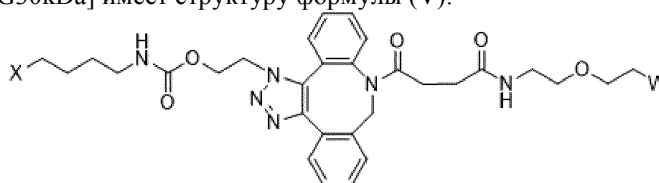
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 172. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 171, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198.

Вариант осуществления 173. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 171, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153.

Вариант осуществления 174. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 171, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140.

Вариант осуществления 175. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где [AzK_L1_PEG30kDa] имеет структуру формулы (V):



формула (V);

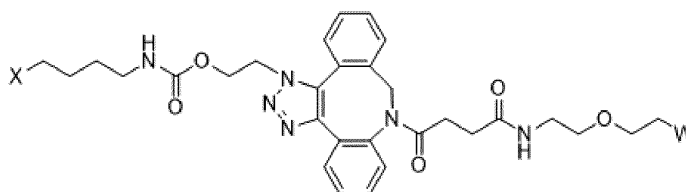
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 176. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 175, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198.

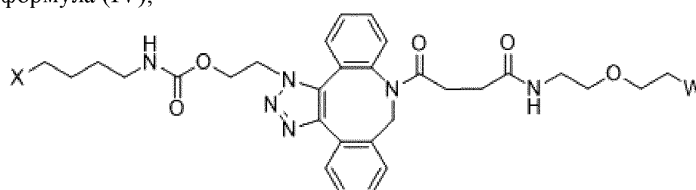
Вариант осуществления 177. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 175, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 139-153.

Вариант осуществления 178. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 175, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185 или 140.

Вариант осуществления 179. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [AzkLIPEG] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):



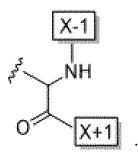
формула (IV);



формула (V);

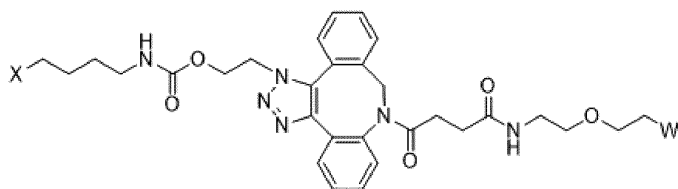
где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру

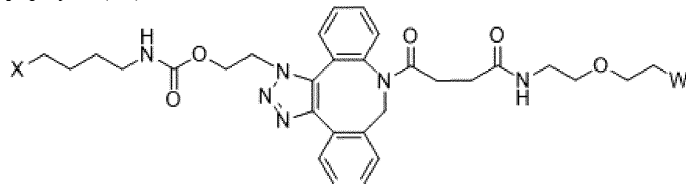


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 179.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 154-168 и 109-123, где [Azk_L1_PEG] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):



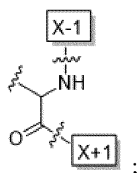
формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу, выбранную из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа; и

X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 180. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-179.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

Вариант осуществления 181. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-179.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

Вариант осуществления 182. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-179.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 183. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-182, где W представляет собой линейную или разветвленную группу PEG.

Вариант осуществления 184. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-182, где W представляет собой линейную группу PEG.

Вариант осуществления 185. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-182, где W представляет собой разветвленную группу PEG.

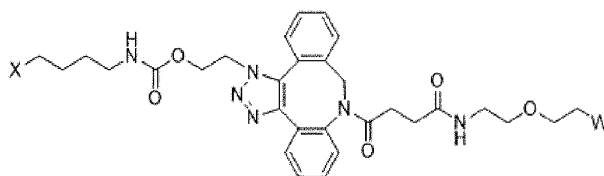
Вариант осуществления 186. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 179-182, где W представляет собой группу метокси-PEG.

Вариант осуществления 187. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 186, где группа метокси-PEG является линейной или разветвленной.

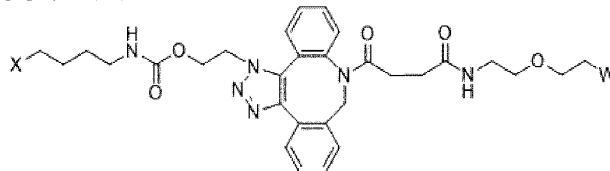
Вариант осуществления 188. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 186, где группа метокси-PEG является линейной.

Вариант осуществления 189. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 186, где группа метокси-PEG является разветвленной.

Вариант осуществления 190. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183 и 124-138, где [AzK_L1_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

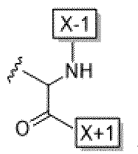


формула (IV);



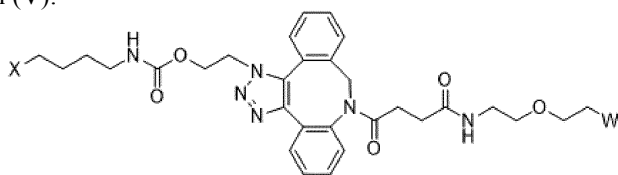
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру

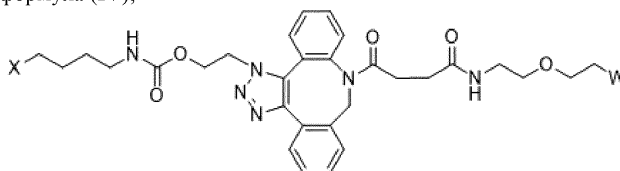


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 190.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 169-183 и 124-138, где [AzK_L1_PEG50kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

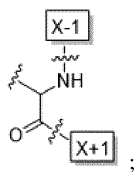


формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 50 кДа; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

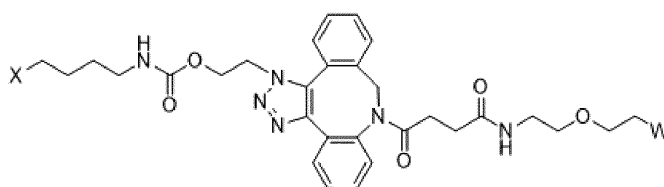
Вариант осуществления 191. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 190-190.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

Вариант осуществления 192. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 190-190.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

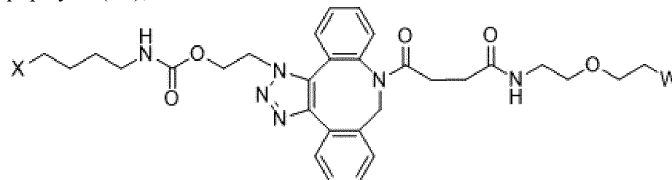
Вариант осуществления 193. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 190-190.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG50kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 194. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

047903

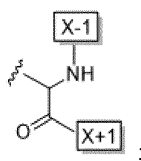


формула (IV);



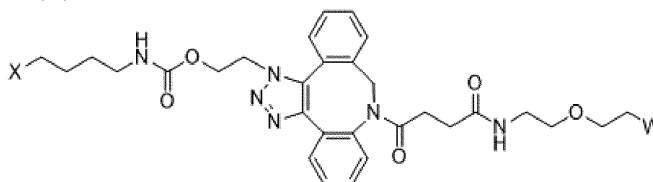
формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру

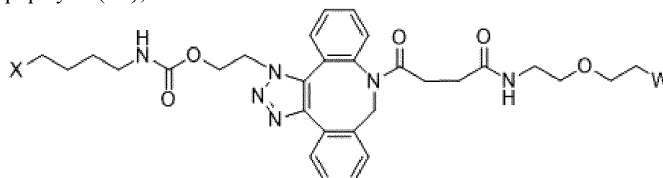


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 194.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 184-198 и 139-153, где [AzK_L1_PEG30kDa] представлен смесью структур формулы (IV) и формулы (V):

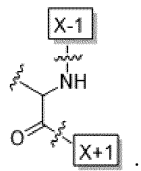


формула (IV);



формула (V);

где W представляет собой группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

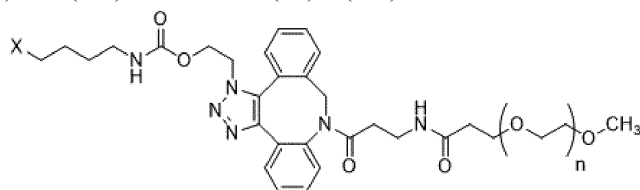
Вариант осуществления 195. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 194-194.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет приблизительно 1:1.

Вариант осуществления 196. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 194-194.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет более 1:1.

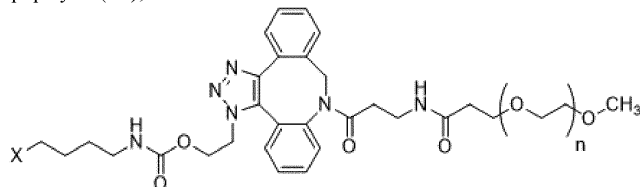
Вариант осуществления 197. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 194-194.1, где соотношение количества структуры формулы (IV) и количества структуры формулы (V), содержащихся в общем количестве [AzK_L1_PEG30kDa] в конъюгате IL-2, составляет менее 1:1.

Вариант осуществления 198. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

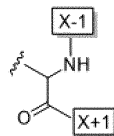


формула (VI);



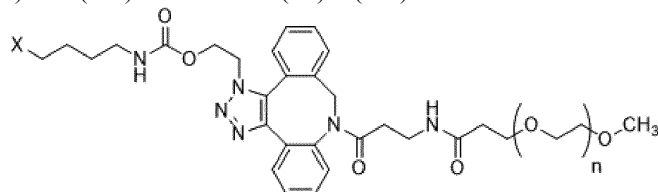
(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

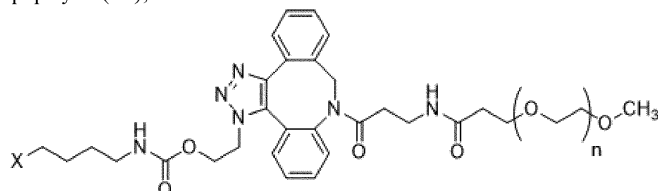


или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 198.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

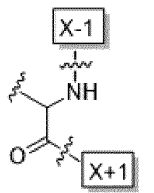


формула (VI);



(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

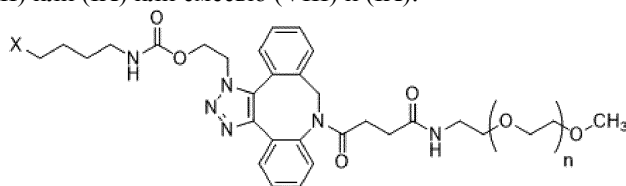


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

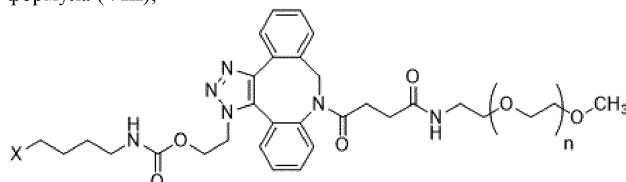
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 199. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 198-198.1, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132.

структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

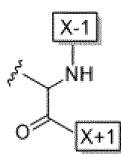


формула (VIII);



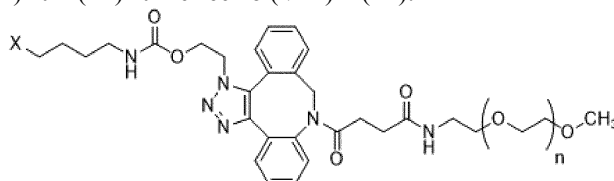
формула (IX);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

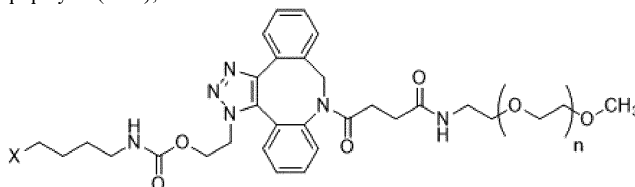


или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 221.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

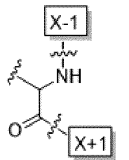


формула (VIII);



формула (IX);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

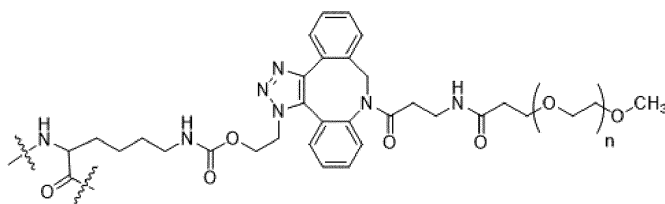


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

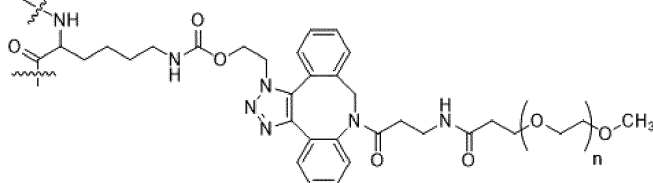
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 222. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 221-221.1, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132.

Вариант осуществления 223. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 222, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в



формула (X);



формула (XI);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3, которые не заменены, или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 245. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 244, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 246. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 245, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 247. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 246, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 248. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8.

Вариант осуществления 249. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15.

Вариант осуществления 250. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18.

Вариант осуществления 251. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19.

Вариант осуществления 252. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22.

Вариант осуществления 253. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25.

Вариант осуществления 254. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87.

Вариант осуществления 255. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90.

Вариант осуществления 256. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение

структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E99.

Вариант осуществления 257. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R.

Вариант осуществления 258. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118.

Вариант осуществления 259. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122.

Вариант осуществления 260. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S124.

Вариант осуществления 261. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 247, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130.

Вариант осуществления 262. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 244-261, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

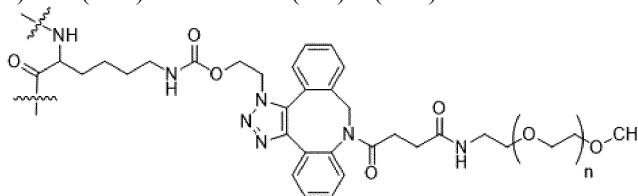
Вариант осуществления 263. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 244-261, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 264. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 244-261, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

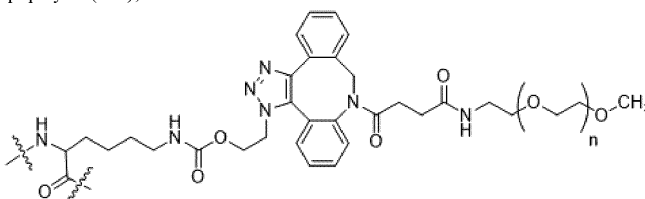
Вариант осуществления 265. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 244-261, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 266. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 244-261, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 267. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XII) или (XIII) или смесью (XII) и (XIII):



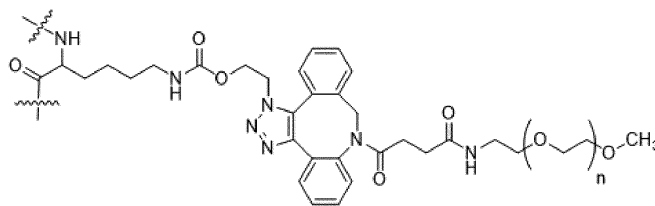
формула (XII);



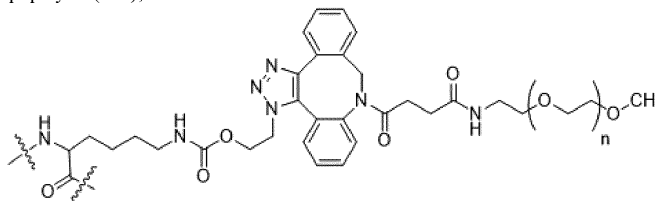
формула (XIII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3, которые не заменены, или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 267.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XII) или (XIII) или смесью (XII) и (XIII):



формула (XII);



формула (XIII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3, которые не заменены.

Вариант осуществления 268. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 267 или 267.1, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 и T132, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 269. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 268, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124, Q125, S126, S129 и T130.

Вариант осуществления 270. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 269, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K8, H15, L18, D19, M22, N25, N87, V90, E99, D108 в варианте N87R, N118, T122, S124 и T130.

Вариант осуществления 271. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K8.

Вариант осуществления 272. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H15.

Вариант осуществления 273. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L18.

Вариант осуществления 274. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D19.

Вариант осуществления 275. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M22.

Вариант осуществления 276. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N25.

Вариант осуществления 277. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N87.

Вариант осуществления 278. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V90.

Вариант осуществления 279. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности

конъюгата IL-2 представляет собой E99.

Вариант осуществления 280. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D108 в варианте N87R.

Вариант осуществления 281. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N118.

Вариант осуществления 282. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T122.

Вариант осуществления 283. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S124.

Вариант осуществления 284. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 270, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T130.

Вариант осуществления 285. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 267-284, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

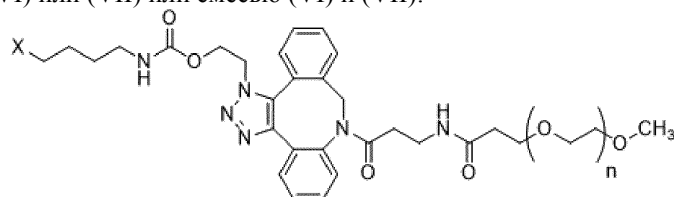
Вариант осуществления 286. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 267-284, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 287. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 267-284, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

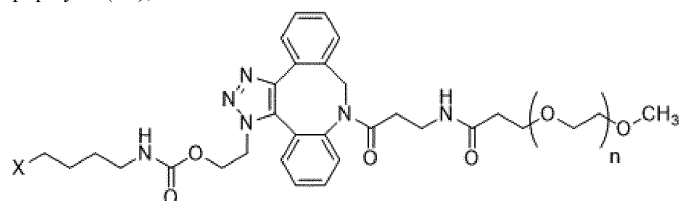
Вариант осуществления 288. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 267-284, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 289. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 267-284, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 290. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

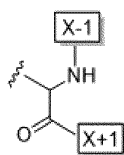


формула (VI);



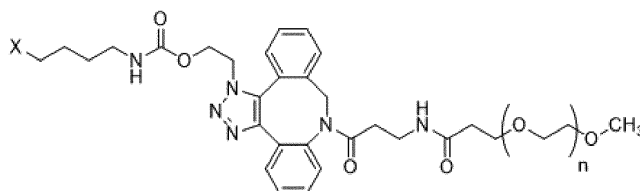
(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру

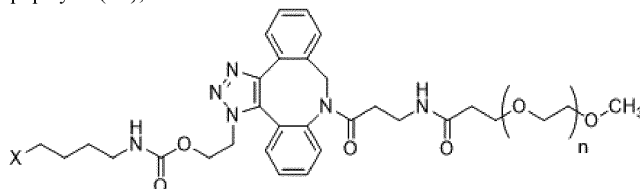


или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 290.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VI) или (VII) или смесью (VI) и (VII):

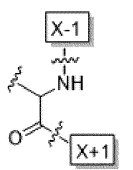


формула (VI);



(VII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру



$X-1$ указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

$X+1$ указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 291. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-290.1, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133x.

Вариант осуществления 292. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 291, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131.

Вариант осуществления 293. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 292, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131.

Вариант осуществления 294. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9.

Вариант осуществления 295. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16.

Вариант осуществления 296. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19.

Вариант осуществления 297. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20.

Вариант осуществления 298. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23.

Вариант осуществления 299. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26.

Вариант осуществления 300. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88.

Вариант осуществления 301. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91.

Вариант осуществления 302. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100.

Вариант осуществления 303. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R.

Вариант осуществления 304. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119.

Вариант осуществления 305. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123.

Вариант осуществления 306. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125.

Вариант осуществления 307. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 293, где положение структуры формулы (VI) или (VII) или смеси (VI) и (VII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

Вариант осуществления 308. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-307, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

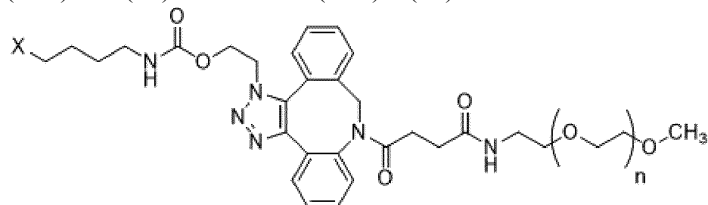
Вариант осуществления 309. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-307, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 310. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-307, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

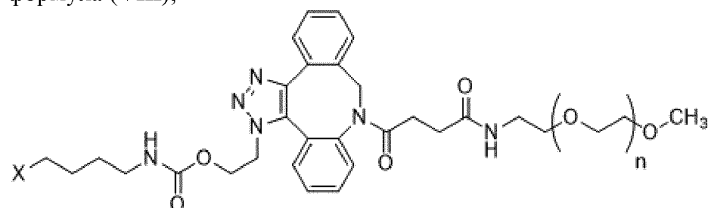
Вариант осуществления 311. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-307, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 312. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 290-307, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 313. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

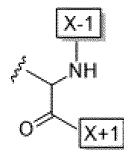


формула (VIII);



формула (IX);

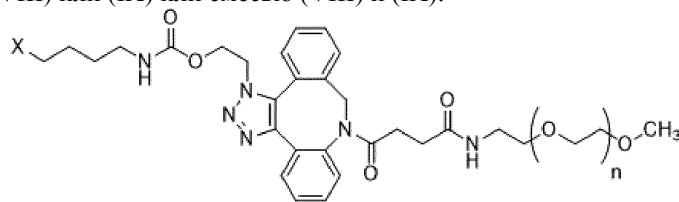
где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру



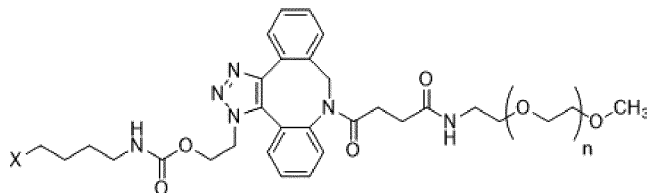
или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 313.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен

структурой формулы (VIII) или (IX) или смесью (VIII) и (IX):

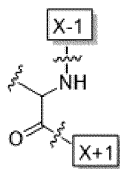


формула (VIII);



формула (IX);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и X имеет структуру



X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

Вариант осуществления 314. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-313.1, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133.

Вариант осуществления 315. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 314, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131.

Вариант осуществления 316. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 315, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131.

Вариант осуществления 317. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9.

Вариант осуществления 318. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16.

Вариант осуществления 319. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19.

Вариант осуществления 320. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20.

Вариант осуществления 321. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23.

Вариант осуществления 322. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26.

Вариант осуществления 323. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26.

югата IL-2 представляет собой N88.

Вариант осуществления 324. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91.

Вариант осуществления 325. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100.

Вариант осуществления 326. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R.

Вариант осуществления 327. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119.

Вариант осуществления 328. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123.

Вариант осуществления 329. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125.

Вариант осуществления 330. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 316, где положение структуры формулы (VIII) или (IX) или смеси (VIII) и (IX) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

Вариант осуществления 331. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-330, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

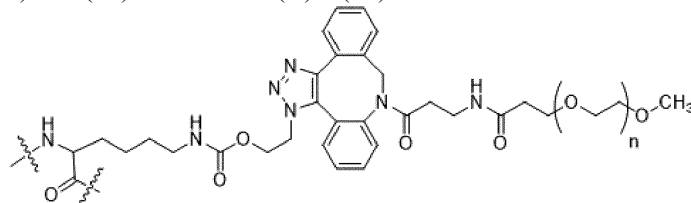
Вариант осуществления 332. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-330, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 333. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-330, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

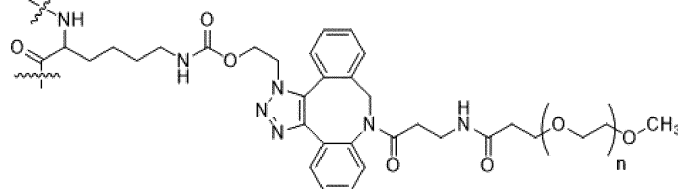
Вариант осуществления 334. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-330, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 335. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 313-330, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 336. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (X) или (XI) или смесью (X) и (XI):



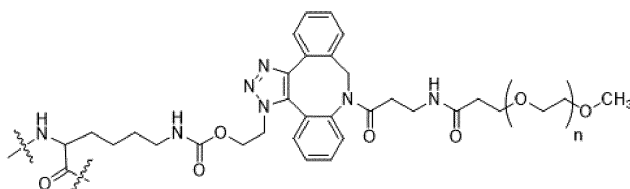
формула (X);



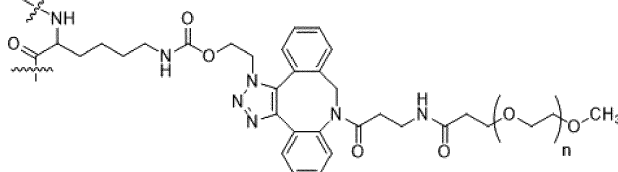
формула (XI);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены, или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 336.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (X) или (XI) или смесью (X) и (XI):



формула (X);



формула (XI);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены.

Вариант осуществления 337. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 336 или 336.1, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133.

Вариант осуществления 338. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 337, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131.

Вариант осуществления 339. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 338, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131.

Вариант осуществления 340. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9.

Вариант осуществления 341. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16.

Вариант осуществления 342. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19.

Вариант осуществления 343. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20.

Вариант осуществления 344. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23.

Вариант осуществления 345. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26.

Вариант осуществления 346. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88.

Вариант осуществления 347. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91.

Вариант осуществления 348. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой E100.

Вариант осуществления 349. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение

структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R.

Вариант осуществления 350. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119.

Вариант осуществления 351. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123.

Вариант осуществления 352. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125.

Вариант осуществления 353. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 339, где положение структуры формулы (X) или (XI) или смеси (X) и (XI) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

Вариант осуществления 354. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 336-353, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

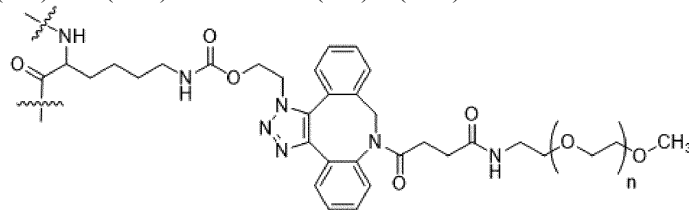
Вариант осуществления 355. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 336-353, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 356. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 336-353, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

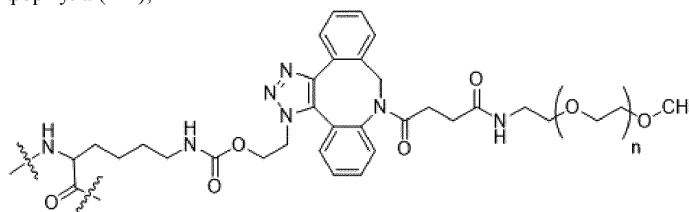
Вариант осуществления 357. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 336-353, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 358. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 336-353, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 359. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XII) или (XIII) или смесью (XII) и (XIII):



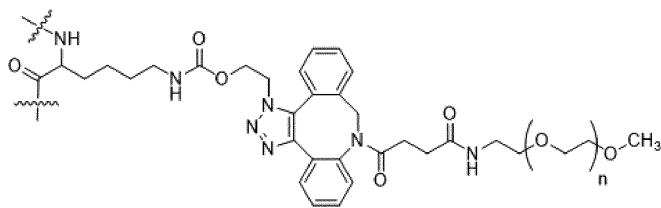
формула (XII);



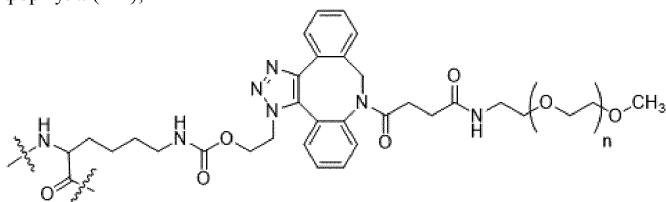
формула (XIII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены, или их фармацевтически приемлемые соль, сольват или гидрат.

Вариант осуществления 359.1. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в конъюгате IL-2 заменен структурой формулы (XII) или (XIII) или смесью (XII) и (XIII):



формула (XII);



формула (XIII);

где n представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5000; и волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4, которые не заменены.

Вариант осуществления 360. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 359 или 359.1, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 и T133.

Вариант осуществления 361. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 360, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125, Q126, S127, S130 и T131.

Вариант осуществления 362. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 361, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 выбрано из K9, H16, L19, D20, M23, N26, N88, V91, E100, D109 в варианте N88R, N119, T123, S125 и T131.

Вариант осуществления 363. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой K9.

Вариант осуществления 364. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой H16.

Вариант осуществления 365. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой L19.

Вариант осуществления 366. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D20.

Вариант осуществления 367. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой M23.

Вариант осуществления 368. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N26.

Вариант осуществления 369. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N88.

Вариант осуществления 370. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой V91.

Вариант осуществления 371. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности

конъюгата IL-2 представляет собой E100.

Вариант осуществления 372. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой D109 в варианте N88R.

Вариант осуществления 373. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой N119.

Вариант осуществления 374. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T123.

Вариант осуществления 375. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой S125.

Вариант осуществления 376. Конъюгат IL-2 согласно варианту осуществления 362, где положение структуры формулы (XII) или (XIII) или смеси (XII) и (XIII) в аминокислотной последовательности конъюгата IL-2 представляет собой T131.

Вариант осуществления 377. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 359-376, где n составляет от приблизительно 75 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 378. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 359-376, где n составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 379. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 359-376, где n составляет от приблизительно 200 до приблизительно 5000.

Вариант осуществления 380. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 359-376, где n составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000.

Вариант осуществления 381. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 359-376, где n составляет от приблизительно 400 до приблизительно 800.

Вариант осуществления 382. Способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-381.

Вариант осуществления 383. Способ согласно варианту осуществления 382, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), атопического дерматита, болезни Крона, очаговой алопеции, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, дерматомиозита, диабета 1 типа, ювенильного/детского диабета 1 типа, ювенильного идиопатического артрита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, тяжелой миастении, рассеянного склероза, пемфигуса/пемфигоида, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного билиарного цирроза, неалкогольного стеатогепатита (NASH), псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, CREST-синдрома, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, тиреоидита, увеита, витилиго, гранулематоза Вегенера, болезни Аддисона (надпочечниковой недостаточности), тиреоидита Хашимото, аутоиммунного гепатита, бесплодия, ANCA-ассоциированного васкулита, псориазического артрита, целиакии, язвенного колита, склерозирующего лишая и болезни Бехчета.

Вариант осуществления 384. Способ согласно варианту осуществления 383, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), атопического дерматита, болезни Крона, диабета 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, тяжелой миастении, первичного билиарного цирроза, неалкогольного стеатогепатита (NASH), гломерулонефрита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, системной красной волчанки, склеродермии, CREST-синдрома, псориаза, целиакии, язвенного колита, пемфигуса, псориазического артрита и бесплодия.

Вариант осуществления 385. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD).

Вариант осуществления 386. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой атопический дерматит.

Вариант осуществления 387. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Крона.

Вариант осуществления 388. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой диабет 1 типа.

Вариант осуществления 389. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

Вариант осуществления 390. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

Вариант осуществления 391. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой тяжелую миастению.

Вариант осуществления 392. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное за-

болевание представляет собой первичный билиарный холангит или первичный билиарный цирроз.

Вариант осуществления 393. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Вариант осуществления 394. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой гломерулонефрит.

Вариант осуществления 395. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру.

Вариант осуществления 396. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

Вариант осуществления 397. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой склеродермию.

Вариант осуществления 398. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой CREST-синдром.

Вариант осуществления 399. Способ согласно варианту осуществления 384, где аутоиммунное заболевание представляет собой бесплодие.

Вариант осуществления 400. Способ согласно любому из вариантов осуществления 382-399, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель или один раз в 8 недель.

Вариант осуществления 401. Способ согласно варианту осуществления 400, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в 4 недели.

Вариант осуществления 402. Способ согласно варианту осуществления 401, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю.

Вариант осуществления 403. Способ согласно варианту осуществления 401, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в две недели.

Вариант осуществления 404. Способ согласно варианту осуществления 401, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в три недели.

Вариант осуществления 405. Способ согласно варианту осуществления 401, где конъюгат IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту один раз в четыре недели.

Вариант осуществления 406. Способ согласно любому из вариантов осуществления 382-405, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие повышенной концентрации ревматоидного фактора в крови субъекта до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2.

Вариант осуществления 407. Способ согласно варианту осуществления 406, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 14 МЕ/мл или выше или приблизительно 15 МЕ/мл или выше.

Вариант осуществления 408. Способ согласно варианту осуществления 407, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 14 МЕ/мл или выше.

Вариант осуществления 409. Способ согласно варианту осуществления 407, где повышенная концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет приблизительно 15 МЕ/мл или выше.

Вариант осуществления 410. Способ лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(a) определение концентрации ревматоидного фактора в крови субъекта и

(b) введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-381, если концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 14 МЕ/мл.

Вариант осуществления 411. Способ согласно варианту осуществления 410, где терапевтически эффективное количество конъюгата IL-2 вводят нуждающемуся в этом субъекту, если концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 15 МЕ/мл.

Вариант осуществления 412. Способ лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-381, если определено, что концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 14 МЕ/мл.

Вариант осуществления 413. Способ лечения ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-381, если определено, что концентрация ревматоидного фактора в крови субъекта составляет более чем приблизительно 15 МЕ/мл.

Вариант осуществления 414. Способ согласно любому из вариантов осуществления 382-405, где у нуждающегося в этом субъекта определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR) согласно результатам теста до введения субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2.

Вариант осуществления 414.1. Способ согласно любому из вариантов осуществления 382-405, где у

Вариант осуществления 455. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 93-93.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77.

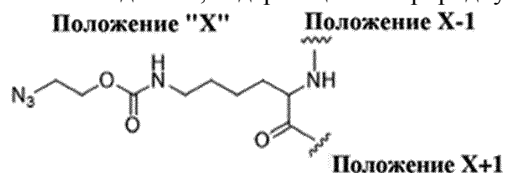
Вариант осуществления 456. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 155-155.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170.

Вариант осуществления 457. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185.

Вариант осуществления 458. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 190.

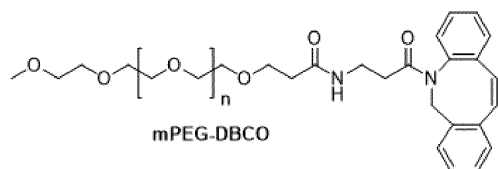
Вариант осуществления 459. Конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 167-167.1, где конъюгат IL-2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 197.

Вариант осуществления 460. Способ получения конъюгата IL-2, включающий: осуществление реакции полипептида IL-2, содержащего не природную аминокислоту формулы



где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в полипептиде IL-2 заменен не природной аминокислотой, положение X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; положение X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку, и положение X указывает на положение аминокислоты, которую заменяет не природная аминокислота,

с mPEG-DBCO формулы



где n является таким, что mPEG-DBCO содержит PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 5 кДа, 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа или 50 кДа, с получением таким образом конъюгата IL-2.

Вариант осуществления 461. Способ согласно варианту осуществления 460, где положение X представляет собой P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8, Q10, L11, E14, H15, L17, L18, D19, Q21, M22, N25, G26, N28, N29, Y30, K31, K34, T36, M45, P46, K47, A49, T50, E51, L52, K53, H54, Q56, E59, E66, N70, Q73, S74, K75, N76, F77, H78, R80, P81, R82, D83, S86, N87, I88, V90, I91, L93, E94, K96, G97, S98, E99, T100, T101, F102, M103, C104, E105, Y106, A107, D108, D108 в варианте N87R, E109, T110, A111, T112, E115, N118, R119, T122, F123, S124, Q125, S126, S129, T130, L131 или T132, относящиеся к положениям аминокислот в SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 462. Способ согласно варианту осуществления 460, где положение X представляет собой A1, P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, P47, K48, A50, T51, E52, L53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, I89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, D109 в варианте N88R, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, S125, Q126, S127, S130, T131, L132 или T133, относящиеся к положениям аминокислот в SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 463. Способ согласно любому из вариантов осуществления 460-462, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в полипептиде IL-2 заменен не природной аминокислотой.

Вариант осуществления 464. Способ согласно любому из вариантов осуществления 460-463, где PEG имеет молекулярную массу приблизительно 30 кДа.

Вариант осуществления 465. Способ согласно любому из вариантов осуществления 460-463, где PEG имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа.

Вариант осуществления 466. Способ согласно варианту осуществления 460, где конъюгат IL-2 представляет собой конъюгат IL-2 согласно любому из вариантов осуществления 1-381 или 442-459.

Примеры

Данные примеры представлены исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают объем представленной в данном документе формулы изобретения.

В каждом из соединений, раскрытых в примере 1, используется SEQ ID NO: 4 и фрагмент [AzK_PEG], где положение замененной аминокислоты в конъюгате IL-2 относится к положениям в последовательности под SEQ ID NO: 4.

Например, соединение, обозначенное как "K9_30kDa" в табл. 3, получали с использованием способов, аналогичных тем, которые описаны в примере 1, где сперва получали белок, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 4, в которой пролин в положении 9 был заменен AzK. Затем проводили реакцию белка в условиях клик-химии с DBCO, содержащим метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа, с получением продукта, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 20, содержащую структуру формулы (II), структуру формулы (III) или смесь структур формул (II) и (III), где W представляет собой метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

В другом примере соединение, обозначенное как "H16_30kDa" в табл. 3, получали сперва посредством получения белка, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 4, в которой пролин в положении 16 был заменен AzK. Затем проводили реакцию белка в условиях клик-химии с DBCO, содержащим метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа, с получением продукта, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 21, содержащую структуру формулы (II), структуру формулы (III) или смесь структур формул (II) и (III), где W представляет собой метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

В другом примере соединение, обозначенное как "N26_30kDa" в табл. 3, получали сперва посредством получения белка, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 4, в которой глутаминовая кислота в положении 26 была заменена AzK. Затем проводили реакцию белка в условиях клик-химии с DBCO, содержащим метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа, с получением продукта, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 25, содержащую структуру формулы (II), структуру формулы (III) или смесь структур формул (II) и (III), где W представляет собой метокси, линейную группу PEG, имеющую среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Иллюстративная подробная процедура получения соединений IL-2, применяемых в данном документе, является следующей. Конъюгаты IL-2 экспрессировали в виде телец включения в *E. coli* с применением способов, раскрытых в данном документе, при этом получали плазмиды экспрессии, кодирующие белок с требуемой аминокислотной последовательностью, которые содержали (а) неприродную пару оснований, содержащую первый неприродный нуклеотид и второй неприродный нуклеотид, для обеспечения наличия кодона в требуемом положении, в которое включали неприродную аминокислоту N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин (AzK), и соответствующего антикодона в тРНК, (б) плазмиду, кодирующую тРНК, полученную из *Pyl M. mazei*, которая содержит неприродный нуклеотид для обеспечения наличия соответствующего антикодона вместо своей нативной последовательности, (с) плазмиду, кодирующую пирролизил-тРНК-синтазу, полученную из *M. barkeri* (MbPylRS), и (d) N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин (AzK). Двухнитевой олигонуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность желаемого варианта IL-2, содержит кодон АХС, например, в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 36, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 59, 66, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 108 в варианте N87R, 109, 110, 111, 112, 115, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 129, 130, 131 или 132 последовательности, которая кодирует белок, характеризующийся SEQ ID NO: 3, или в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 37, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 60, 67, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 109 в варианте N88R, 110, 111, 112, 113, 116, 119, 120, 123, 125, 126, 127, 130, 131, 132 или 133 последовательности, которая кодирует белок, характеризующийся SEQ ID NO: 4, где X представляет собой неприродный нуклеотид, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит плазмиду, которая может представлять собой плазмиду экспрессии белка или другую плазмиду, которая кодирует ген ортогональной тРНК из *M. mazei*, которая содержит антикодон GYT, соответствующий АХС, вместо своей нативной последовательности, где Y представляет собой неприродный нуклеотид, раскрытый в данном документе, и может быть таким же, как неприродный нуклеотид в кодоне, или отличаться от него. X и Y выбраны из неприродных нуклеотидов dTPT3, dNaM и dCNMO, раскрытых в данном документе. Экспрессируемый белок очищали и подвергали рефолдингу с использованием стандартных процедур перед сайт-специфическим пегилированием AzK-содержащего продукта на основе IL-2 с использованием DBCO-опосредованной клик-химии без использования меди для стабильного ковалентного присоединения фрагментов mPEG к AzK (см. схема 1 ниже).

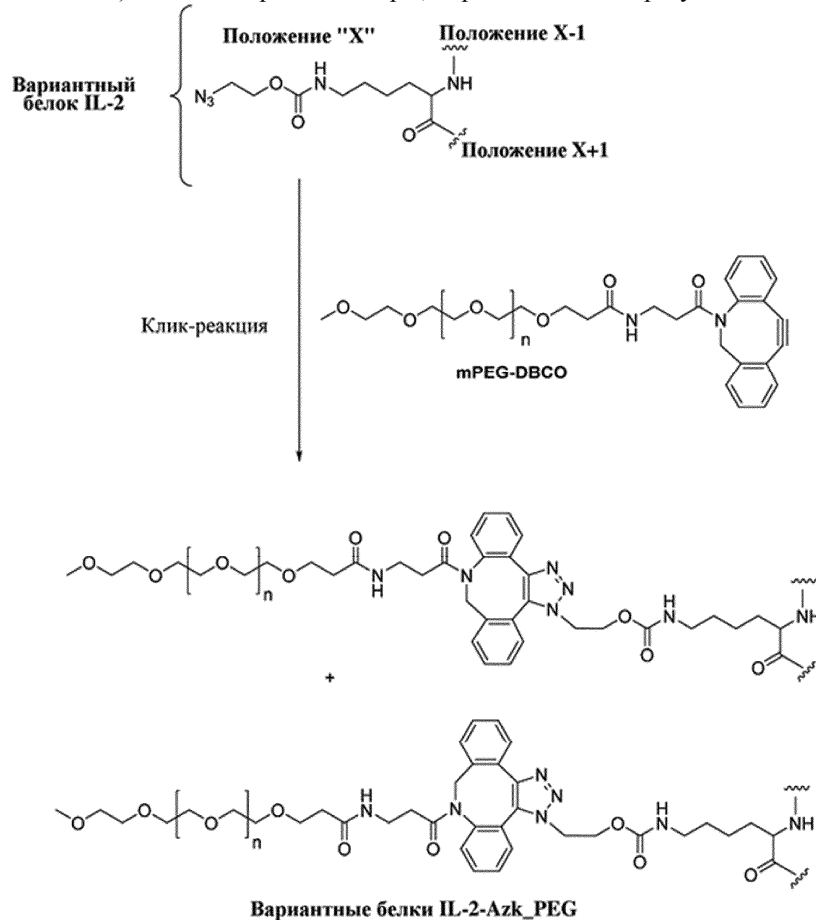
Пример 1.

Ex-vivo определение профиля иммунного ответа иллюстративных соединений IL-2 в образцах PBMC, полученных с помощью системы редукции первичных лейкоцитов человека (LRS).

Для определения того, как разная рецепторная специфичность иллюстративных соединений IL-2 влияет на активацию субпопуляций первичных клеток иммунной системы, осуществляли определение профиля зависимости "концентрация-ответ" для активации лимфоцитов в образцах мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, полученных с помощью LRS, с применением многоцветной проточной цитометрии. Конъюгаты из табл. 3 синтезировали с помощью модификации SEQ ID NO: 1.

Иллюстративные конъюгаты IL-2, которые подвергали функциональному анализу, показаны в табл. 3. Конъюгаты IL-2 экспрессировали в виде телец включения в *E. coli*, очищали и подвергали повторному фолдингу с использованием стандартных процедур перед сайт-специфическим пегилированием продукта IL-2 с применением DBCO-опосредованной клик-химии без участия меди для стабильного ковалентного присоединения фрагментов mPEG к AzK (схема 1).

Схема 1. Иллюстративный синтез вариантов AzK_PEG интерлейкина (где n обозначает число повторяющихся звеньев PEG). Показаны региоизомеры, образовавшиеся в результате клик-реакции.



Данные исследования проводили в PrimityBio LLC (Фримонт, Калифорния). Первичные лимфоциты, полученные из образцов LRS человека, обрабатывали серией разбавлений иллюстративных соединений IL-2 и определяли количественно на основании передачи сигнала pSTAT5 в каждом типе лимфоцитарных клеток с использованием панели, показанной в табл. 2.

Таблица 2

Обозначение, указывающее популяции клеток

Маркер	Популяция клеток
CD3	T-клетки
CD4	Th-клетки
CD8	Эффекторные T-клетки
CD45RA	Наивные T-клетки
CD56	NK-клетки
CD14/19	Моноцит/В-клетки
CD25	Tрег или «обученная» T-клетки
CD127	Клетка, не являющаяся Трег
CD62L	T-клетка памяти против эффекторной T-клетки памяти
pSTAT5 (Y694)	Маркер активации

Данные проточной цитометрии анализировали в отношении активации различных субпопуляций T- и NK-клеток в режиме "концентрация-ответ", считывая накопление pSTAT5 после обработки с помощью иллюстративного варианта IL-2 K9_30kDa.

На фиг. 4A - фиг. 4B показаны кривые зависимости доза-ответ для передачи сигнала pSTAT5 в первичной клетке человека, полученной с помощью LRS (фиг. 4A), и ответ в виде пролиферации в популяциях мышиных CTLL-2 (фиг. 4B).

В табл. 3 показана EC50 зависимости доза-ответ для передачи сигнала pSTAT5 (EC50) при пролиферации образцов LRS человека или CTLL-2 при обработке указанным вариантом IL-2.

Таблица 3

EC50 зависимости доза-ответ для передачи сигнала pSTAT5 (EC50) при пролиферации образцов LRS человека или CTLL-2 при обработке указанным вариантом IL-2

Соединение	NK-клетки	CD8+ T-клетки	Tрег-клетки	Соотношение CD8+/Tрег	Кратность повышения EC50 Трег по сравнению с нативным IL-2	Пролиферация CTLL-2
Нативный IL-2	4586	31024	75	414	1	455,8
K9_30kDa	169578	1100679	2217	496	30	504
H16_30kDa	2545257	12070108	34976	345	466	80755
L19_30kDa	6756768	22436430	93205	241	1243	3510
D20_30kDa	2643930	9505217	1129455	8	15059	689939
M23_30kDa	143620	539824	1030	524	14	1102
N26_30kDa	258531	1188859	2459	483	33	2594
N88_30kDa	3298113	11111537	323201	34	4309	66606
E100_30kDa	35088	195823	483	405	6	1676
N119_30kDa	34010	143380	535	268	11	1215
T123_30kDa	33396	152928	269	569	6	255
Q126_30kDa	3676807	19722480	29454	670	393	3584
S127_30kDa	20210	92190	150	615	3	123
T131_30kDa	24207	132922	258	515	3	641
N88R/D109_30kDa	2780819	12503386	175805	71	3663	59577
V91K	20537	102255	142	720	3	99,5
N88R	2312847	15025734	11082	1356	148	363

Значения EC50 (пг/мл) вычисляли по кривым зависимости доза-ответ, полученным из графиков MFI. *Изменение эффективности Трег по сравнению с нативным IL-2 (IL-2 дикого типа) анализировали в каждом отдельном эксперименте.

Пример 2.

Конструкция конъюгатов PEG-IL-2, которые предпочтительным образом снижают передачу сигналов по бета-гамма рецептору IL-2 по сравнению с альфа-бета-гамма-комплексом IL-2 R.

Для идентификации сайтов пегилирования полипептида под SEQ ID NO: 3 или 4 использовали структурные данные сигнального комплекса IL-2/гетеротримерный рецептор (PDB: 2ERJ, [Stauber 2006]) для управления конструированием конъюгатов IL-2. Получаемые в результате конъюгаты IL-2 получали, как описано в данном документе. Белки, содержащие неприродную аминокислоту N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин (AzK), экспрессировали в виде телец включения в *E. coli*, очищали и подвергали рефолдингу с использованием процедур, известных специалистам в уровне техники. Затем белкам, содержащим AzK, давали возможность прореагировать с реагентом, содержащим DBCO, содержащим необходимую группу PEG (например, группу PEG, имеющую размер, выбранный из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 кДа), чтобы получить необходимый конъюгат IL-2.

Пример 3.

Конструкция и скрининг конъюгатов PEG-IL-2, которые предпочтительно снижают передачу сигналов по бета-гамма рецептору IL-2 по сравнению с альфа-бета-гамма-комплексом IL-2 R.

Различные конъюгаты IL-2, имеющие SEQ ID NO: 4, в которой аминокислотный остаток в указанном положении был заменен структурой формулы (II), формулы (III) или смесью структур формул (II) и (III), имеющих указанный размер PEG, подвергали скринингу на функциональную активность в Discoverx (Фримонт, Калифорния) с использованием анализа цитокиновых рецепторов IL-2 PathHunter. Например, соединения, обозначенные как "D20_30" в данном примере, представляют собой соединение, имеющее SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку D20 (SEQ ID NO: 67) группой PEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа. Аналогично следующие соединения тестировали в данном примере:

Таблица 4(a)

Соединение	Структура
H16_30	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку H16 (SEQ ID NO: 65) линейной группой mPEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
D20_30	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку D20 (SEQ ID NO: 67) линейной группой mPEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
N88_30	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку N88 (SEQ ID NO: 70) линейной группой mPEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
L12_30	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку L12 (SEQ ID NO: 244) линейной группой mPEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
E15_30	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку E15 (SEQ ID NO: 245) линейной группой mPEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа

В данном анализе применяли рекомбинантную линию клеток U2OS человека, которая экспрессиру-

ет субъединицы бета (IL-2R-бета) и гамма (IL-2R-гамма) рецептора IL-2, каждая из которых слита с половиной разделенного репортерного фермента. Конструировали вторую линию клеток для экспрессии субъединицы IL-2R-альфа. Параллельное тестирование с этими двумя линиями клеток позволяет оценить активацию варианта рецептора IL-2-альфа-бета-гамма, а также базального комплекса бета-гамма. Активность агониста IL-2 в отношении рецепторного комплекса IL-2-бета-гамма стимулирует димеризацию рецептора и восстановление репортерной бета-галактозидазы, что приводит к генерированию хемиллюминесцентного сигнала. Анализ проводили в режиме агонизма для определения эффективности (EC₅₀) каждого тестируемого конъюгата IL-2 и определяли профили кривой зависимости доза-ответ между положительными и отрицательными по IL-2R-альфа типами клеток для каждого тестируемого конъюгата IL-2.

Методика анализа Discoverx для определения агонистической активности в отношении рецептора IL-2-бета-гамма и альфа-бета-гамма.

Обеспечивали размножение клеточных линий PathHunter из замороженных исходных культур в соответствии со стандартными процедурами. Клетки высевали в общем объеме 20 мкл в 384-луночные микропланшеты с белыми стенками и инкубировали в течение соответствующего периода времени перед анализом. Для выявления агонистической активности клетки инкубировали с конъюгатом IL-2 для тестирования индукции ответа. Осуществляли промежуточное разбавление исходных культур для получения 5X образца в буфере для анализа. Приблизительно 5 мкл 5X образца добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C в течение периода от 6 до 16 ч в зависимости от анализа. Концентрация среды-носителя составляла 1%. Сигнал в ходе анализа генерировали путем однократного добавления 12,5 или 15 мкл (50% об./об.) коктейля детекторных реагентов PathHunter для анализов на агонистическую и антагонистическую виды активности соответственно с последующим инкубированием в течение одного часа при комнатной температуре. В случае некоторых анализов активность детектировали с использованием высокочувствительного детектирующего реагента (PathHunter Flash Kit) с целью улучшения эффективности анализа. В ходе данных анализов в лунки добавляли равный объем детекторного реагента (25 мкл или 30 мкл) с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение одного часа. Считывание микропланшетов проводили после генерирования сигнала с помощью прибора EnVision от PerkinElmer для детекции хемиллюминесцентного сигнала.

Активность соединений анализировали с использованием пакета программного обеспечения для анализа данных CBIS (ChemInnovation, Калифорния). Процент активности рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ активности} = 100\% \times (\text{средняя RLU анализируемого образца} - \text{средняя RLU контрольной среды-носителя}) / (\text{средняя MAX RLU контрольного лиганда} - \text{средняя RLU контрольной среды-носителя}).$$

Активность соединения показана на фиг. 5A, 5B и 5C.

Данные по эффективности (EC₅₀) в отношении агонизма рецептора IL-2 при клеточном скрининге конъюгатов IL-2 показаны в таблице ниже. Значения EC₅₀ приведены в нанограммах конъюгата IL-2 на мл. Следует обратить внимание, что для облегчения сравнения пегилированных и непегилированных соединений указанное значение массы соответствует массе полипептида IL-2 в каждом конъюгате IL-2 и не включает массу mPEG или линкерных компонентов.

Таблица 4(b)

Конъюгат IL-2	Альфа-бета-гамма, EC ₅₀ (нг/мл)	Бета-гамма, EC ₅₀ (нг/мл)
Нативный IL-2	2,6	56
K9	< 0,5	531
L12	0,6	1375
E15	0,1	187
N88	19,6	16190
M23	0,1	367
H16	3,3	5742
L19	0,14	4265
D20	24	18660
E100	1,4	454

Пример 4.

Скрининг конъюгатов IL-2 у мышей.

Чтобы охарактеризовать фармакокинетические и фармакодинамические эффекты каждого конъюгата IL-2 у мышей, каждый конъюгат, описанный в табл. 5(a), вводили в виде однократной подкожной инъекции наивным мышам C57/BL6 в дозе приблизительно 0,9 мг/кг (примечание - дозу определяли путем измерения массы полипептидного белка, и при этом массу полиэтиленгликоля или линкерных фрагментов не включали). Образцы собирали посредством терминального забора крови, как указано в табл. 5 (a), при этом их сбор осуществляли в указанные моменты времени, и подвергали анализу фармакокинетики с использованием ELISA и проточной цитометрии для количественной оценки передачи сигналов, активации и пролиферации отдельных популяций лимфоцитов. Все соединения, применяемые в данном исследовании, за исключением N88_30kD, имеют SEQ ID NO: 4, в которой аминокислота в указанном

положении заменена структурой формулы (II), формулы (III) или смеси формулы (II) и формулы (III), при этом замена выполнена по указанному аминокислотному остатку, содержащему линейную группу mPEG, имеющую молекулярную массу 30 кДа. В случае варианта N88_30kD соединение имело последовательность SEQ ID NO: 4, в которой аминокислота в указанном положении заменена структурой формулы (IV), формулы (V) или смеси формулы (IV) и формулы (V), при этом замена выполнена по указанному аминокислотному остатку, содержащему линейную группу mPEG, имеющую молекулярную массу 30 кДа.

Таблица 5(а)

Подробности исследования РК/PD у мышей

Конъюгат IL-2	Доза (мг/кг)	Путь введения дозы	Момент времени сбора (дни)	Сбор
Среданоситель	0	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
K9_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
L19_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
Q126_30kD	0,4	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
E100_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
N88R/D109_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
T123_30kD	0,8	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
N88_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови
H16_30kD	0,9	подкожный	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	терминальный забор крови

Биологический анализ образцов плазмы крови проводили с использованием коммерчески доступного ELISA-анализа IL-2 человека (Abscam, Кембридж, Великобритания). Значения концентрации каждого введенного конъюгата IL-2 и внутреннего стандарта в образцах, полученных из плазмы крови, определяли в соответствии с инструкциями производителя, и каждый момент времени измеряли в условиях в пределах линейного диапазона стандартного измерения. На фиг. 6 показаны профили концентрации в плазме крови конъюгатов IL-2 K9_30kD, L19_30kD, N88R/D109_30kD, H16_30kD, Q126_30kD и N88_30kD (все в дозе, составляющей 0,9 мг/кг).

Чтобы охарактеризовать фармакодинамические эффекты конъюгатов IL-2 у мышей, каждый конъюгат вводили в виде однократной подкожной инъекции наивным мышам C57/B16 в дозе приблизительно 0,9 мг/кг (примечание - дозу определяли путем измерения массы полипептидного белка, и при этом массу полиэтиленгликоля или линкерных фрагментов не включали). Образцы собирали посредством терминального забора крови, как указано в табл. 5(б). Составление соединений, введение доз и сбор образцов проводили в Crown Bio (Ла Хойя, Калифорния). Фармакодинамический анализ с применением проточной цитометрии проводили в PrimityBio (Фримонт, Калифорния) и данный анализ применяли для количественной оценки передачи сигналов, активации и пролиферации отдельных популяций лимфоцитов.

Таблица 5(б)

Маркерная панель для исследования конъюгатов IL-2
методом проточной цитометрии у мышей C57/BL6

Проточная цитометрия Маркерная панель
CD3
CD4
CD8
CD44
CD25
FoxP3
NK1.1
STAT5
Ki-67
ICOS
Helios

Клетки вначале гейтировали по синглетам с использованием FSC-A по FSC-HOUR, чтобы исключить любые агрегаты или дублеты. В данном гейте клетки гейтировали по прямому рассеянию от среднего до высокого (FSC-A) и боковому рассеянию (SSC-A), чтобы исключить эритроциты и дебрис. Затем T-

клетки гейтировали как популяцию CD3+. Затем Т-клетки разделяли на CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. Затем клетки Treg гейтировали из CD4+ Т-клеток как популяцию CD25+ FoxP3+. NK-клетки идентифицировали из CD3-отрицательной популяции как NK1.1-положительную популяцию. Статистические данные и построение графика для получения значений EC₅₀, медианную интенсивность флуоресценции (MFI) для каждого из популяции клеток, донора и введенного конъюгата IL-2 рассчитывали по сигналу в канале, выявляющем фосфорилированный STAT5, с использованием программного обеспечения CellEngine. Статистические данные анализировали с помощью Spotfire. В Spotfire данные наносили на логарифмическую шкалу для доз конъюгата IL-2 и линейную шкалу для считываемых показателей MFI. Эти данные подбирали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии. EC₅₀ рассчитывали как точку перегиба кривой. Для каждого тестируемого конъюгата IL-2 клетки Treg (CD3+CD4+CD25 high FoxP3+) количественно определяли в синглетах (наблюдаемое общее количество лимфоцитов). Среднее кратное изменение Treg (% в синглетах) от трех независимых животных нанесено на график для каждого конъюгата IL-2, которое при этом представлено как максимальное процентное содержание Treg в синглетах/процентное содержание Treg в синглетах в образцах до введения дозы. Каждая полоса представляет собой стандартную ошибку указанного среднего значения. Результаты, показывающие максимальное кратное изменение процентного содержания Treg в синглетах у мышей, произошедшее в результате подкожного введения дозы конъюгатов IL-2, показаны на фиг. 7.

Определяли процентное содержание Treg в синглетах в зависимости от времени после однократного подкожного введения конъюгатов IL-2 мышам C57/BL6. Для каждого конъюгата IL-2 образцы подвергали проточной цитометрии для идентификации и количественного определения доли клеточной популяции Treg (CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+) в общей клеточной популяции (синглеты). На фиг. 8 показаны данные для IL-2 K9_30kD, L19_30kD, Q126_30kD и H16_30kD.

На фиг. 9А показана доля популяции Т-клеток CD8+ (CD3+ CD4- CD8+) в общей популяции клеток (синглеты) у мышей C57/BL6 для конъюгатов IL-2 K9_30kD, L19_30kD, Q126_30kD и H16_30kD. Каждая точка представляет среднее значение для трех независимых животных, планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения.

На фиг. 9В показана популяция Т-клеток CD8+ (CD3+ CD4- CD8+) в общей популяции клеток (синглеты) для конъюгатов IL-2 E100_30kD, N88R/D109_30kD, T123_30kD, N88_30kD и конъюгатов V91_30kD у мышей C57/BL6. Каждая точка представляет среднее значение для трех независимых животных, планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения.

Пример 5.

Фармакокинетический анализ конъюгатов IL-2 после подкожного введения яванским макакам.

Следующие соединения, показанные в табл. 6, применяли в примере 5.

Таблица 6

Соединение	Структура
H16_30kD	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку H16 (SEQ ID NO: 65) группой PEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
N88_30kD	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (IV), формулы (V) или смеси формул (IV) и (V) была заменена по остатку N88 (SEQ ID NO: 190) группой PEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа
L19_30kD	SEQ ID NO: 4, в которой структура формулы (II), формулы (III) или смеси формул (II) и (III) была заменена по остатку L19 (SEQ ID NO: 66) группой PEG, имеющей молекулярную массу 30 кДа

N88R/D109_30kD	SEQ ID NO: 4, в которой N88 заменен с использованием R и структура формулы (IV), формулы (V) или смеси формул (IV) и (V) была заменена по остатку D109 (SEQ ID NO: 197) группой PEG, имеющей
	молекулярную массу 30 кДа

Дозы L19_30kD, H16_30kD и N88_30kD вводили подкожно трем самцам яванских макаков при дозах 0,37 мг/кг N88_30kD, 0,03 мг/кг L19_30kD, 0,16 мг/кг L19_30kD, 0,12 мг/кг H16_30kD, 0,67 мг/кг H16_30kD и 0,2 мг/кг H16_30kD. Профили концентрации в плазме крови для конъюгатов IL-2 L19_30kD, H16_30kD и N88_30kD показаны на фиг. 10.

Дозы конъюгатов IL-2 N88_30kD, L19_30kD, H16_30kD и H16_50kD вводили подкожно трем самцам яванских макаков при дозах 0,37 мг/кг N88_30kD, 0,2 мг/кг H16_30kD, 0,67 мг/кг H16_30kD, 0,03 мг/кг L19_30kD, 0,16 мг/кг L19_30kD, 0,2 мг/кг H16_50kD и 0,8 мг/кг H16_50kD в день 0. Для каждого конъюгата IL-2 образцы периферической крови собирали в указанные моменты времени и образцы подвергали проточной цитометрии для идентификации и количественного определения доли популяции клеток Treg в общей популяции клеток крови (синглетов). Каждая точка представляет среднее значение для трех независимых животных, планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения. Биоанализ образцов плазмы крови выполняли с использованием ELISA-анализа человеческого IL-2, который предусматривает захват конъюгатов IL-2 на поверхности с использованием антител к IL-2 и обеспечивает выявление конъюгатов IL-2 с помощью антител к PEG. Определяли значения концентрации каждого тестового изделия и внутреннего стандарта в образцах, полученных из плазмы крови, и в каждый момент времени проводили измерения в условиях в пределах линейного диапазона стандартного измерения. Результаты, демонстрирующие идентичность и количественное значение доли популяции клеток Treg в общей популяции клеток крови (синглетов) у яванских макаков после введения доз конъюгатов IL-2 N88_30kD, H16_30kD, H16_50kD и L19_30kD, показаны на фиг. 11.

Дозы конъюгатов IL-2 N88_30kD, L19_30kD, H16_30kD и H16_50kD вводили подкожно трем самцам яванских макаков при дозах 0,37 мг/кг N88_30kD, 0,03 мг/кг L19_30kD, 0,16 мг/кг L19_30kD, 0,12 мг/кг H16_30kD, 0,67 мг/кг H16_30kD, 0,2 мг/кг H16_50kD и 0,80 мг/кг H16_50kD в день 0. Результаты, демонстрирующие идентичность и количественное значение доли популяции T-клеток CD8⁺ в общей популяции клеток крови (синглетов) у яванских макаков после введения доз конъюгатов IL-2 N88_30kD, H16_30kD, H16_50kD и L19_30kD, показаны на фиг. 12.

Пример 6.

Введение яванским макакам доз конъюгатов IL-2.

Дозы конъюгатов IL-2, описанных в табл. 7 ниже, вводили яванским макакам, при этом предусматривалось по 3 самца в каждой группе введения (всего 24 животных). Животным однократно подкожно вводили дозу указанного конъюгата IL-2 в день 0. Каждый из описанных ниже конъюгатов, за исключением H16_30kDa и H16_50kDa, имел SEQ ID NO: 4, в которой указанное положение аминокислоты заменено структурой формулы (II), формулы (III) или смеси формулы (II) и (III), и при этом они содержали PEG-цепь указанного размера. Например, вариант обозначенный как "L19_30kDa" имеет SEQ ID NO: 4, в которой аминокислота в положении L19 заменена структурой формулы (II), формулы (III) или смеси формулы (II) и (III), и содержит 30-кДа линейную группу mPEG. В случае вариантов H16_30kDa и H16_50kDa соединения имеют SEQ ID NO: 4, в которой указанное положение аминокислоты заменено структурой формулы (IV), формулы (V) или смеси формулы (IV) и (IV), и линейная группа mPEG имеет молекулярную массу 30 кДа или 50 кДа соответственно.

Таблица 7

Группа	Тестовое изделие	Уровень дозы (мг/кг)
1	Среда-носитель	NA
2	N88_30kDa	0,37
3	L19_30kDa	0,03
4	L19_30kDa	0,16
5	H16_30kDa	0,12
6	H16_30kDa	0,67
7	H16_50kDa	0,2
8	H16_50kDa	0,8

Образцы крови отбирали у каждого животного в моменты времени, указанные далее. Образцы для

гематологии: день -1, день 1 (перед введением дозы), 3, 6, 10, 15 и 22. Образцы для фармакокинетики и фармакодинамики: (перед введением дозы), 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 240, 360, 528 (день 22) часов после введения дозы. Сбор образцов и их анализ на предмет присутствующих в них цитокинов: день -1 и день 1 (перед введением дозы), 8, 24, 72, 120 и 168, 360 и 528 (день 22) часов после введения дозы.

Пиковое кратное изменение количества лейкоцитов (WBC), пиковое кратное изменение количества лимфоцитов и день, когда наблюдали пиковое количество лимфоцитов, для каждого конъюгата IL-2 указаны в табл. 8.

Таблица 8

№ группы	Конъюгат IL-2	Уровень дозы (мг/кг)	Пиковое кратное изменение количества WBC	Пиковое кратное изменение количества лимфоцитов	Дата достижения пикового количества лимфоцитов
1	Средо-носитель	0	1,04	1,05	перед введением дозы
2	N88_30kDa	0,37	1,05	1,19	6 дней после введения
3	L19_30kDa	0,03	1,14	1,28	6 дней после введения
4	L19_30kDa	0,16	2,49	3,21	6 дней после введения
5	H16_30kDa	0,12	1,24	1,31	6 дней после введения
6	H16_30kDa	0,67	2,3	2,76	6 дней после введения
7	H16_50kDa	0,2	1,71	2,25	10 дней после введения
8	H16_50kDa	0,8	2,9	3,38	10 дней после введения

Фармакокинетические параметры для варианта H16_30kD у приматов, отличных от человека, при дозах 0,12 мг/кг и 0,67 мг/кг показаны в табл. 9 ниже, а графики зависимости концентрации в плазме крови от времени для варианта H16_30kD при дозе 0,12 мг/кг и 0,67 мг/кг показаны на фиг. 13 (доза 0,12 мг/кг показана в виде нижней кривой, а доза 0,67 мг/кг показана в виде верхней кривой).

Таблица 9

Доза варианта H16_30kD	Среднее значение $t_{1/2}$ (часы)	Среднее значение AUC от нуля до момента времени отбора последней пробы (ч*нг/мл)	Среднее значение C _{max} (нг/мл)
0,12 мг/кг	17,2	18,349	361
0,67 мг/кг	18,0	71,940	1,358

Графики концентрации в плазме крови варианта H16_30kDa в дозе 0,12 мг/кг и варианта H16_50kDa в дозе 0,2 мг/кг показаны на фиг. 14, где кривая для варианта 30 кДа показана в виде нижней кривой (квадраты), а кривая для варианта 50 кДа показана в виде верхней кривой (треугольники). График процентного содержания клеток T_{reg} в синглетах в зависимости от времени после введения дозы в плазме крови приматов, отличных от человека, для варианта H16_30kDa в дозе 0,12 мг/кг и варианта H16_50kDa в дозе 0,2 мг/кг показан на фиг. 15, где кривая для среды-носителя представляет собой нижнюю кривую (квадраты), кривая для варианта 30 кДа показана в виде средней кривой, и кривая для варианта 50 кДа показана в виде верхней кривой.

Пример 7.

Для изучения эффектов конъюгата IL-2 (H16_50kD) в отношении гиперчувствительности замедленного типа (ДТН), индуцированной гемоцианином фисуреллы (KLH), у мышей, ДТН индуцировали у самок мышей C57BL/6 путем сенсibilизации с помощью KLH в день 1 и подвергания воздействию в день 7, и при этом мышам вводили H16_50kD в дни 0 и 3. Подробности плана исследования представлены в

табл. 10, а также на фиг. 16.

Таблица 10

Подробности исследования DTH

Группа	H16_50kD Обработка	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Путь введения дозы, частота	N
1	Подвергание воздействию только KLH+среда- носитель	0	0	SC, QD, день 0 и 3	10
2	KLH+среда- носитель	0	0	SC, QD, день 0 и 3	10
3	KLH+низкая доза	0,03	10	SC, QD, день 0 и 3	10
4	KLH+средняя доза	0,1	10	SC, QD, день 0 и 3	10
5	KLH+высокая доза	0,3	10	SC, QD, день 0 и 3	10
6	KLH+циклоспори н А (CsA)	60	10	PO, QD, дни 1- 9	10

SC: подкожная инъекция; QD: один раз в день.

Индуктирование гиперчувствительности. В день 1 мышам, относящимся к группам 2-6, выполняли внутрилопаточную подкожную (SC) инъекцию эмульсии KLH/CFA/IFA (2,5 мг/мл) в объеме дозы 0,1 мл (доза KLH, составляющая 250 мкг). В день 7 все мыши из групп 1-6 получали внутрикожную (ID) инъекцию KLH (1 мг/мл PBS) в правое ухо (или, при необходимости, в левое ухо) с использованием шприца Hamilton и объема дозы 10 мкл (уровень дозы KLH, составляющий 10 мкг).

Эмульсию KLH/CFA/IFA для сенсibilизации готовили следующим образом: KLH (Calbiochem; кат. № 374807) получали в PBS с обеспечением 3X раствора (7,5 мг/мл). Неполный адъювант Фрейнда (IFA, Sigma) и полный адъювант Фрейнда (CFA, Sigma) помещали в баню со льдом. Раствор KLH предоставляли в 50-мл конической пробирке; и эквивалентный объем CFA и IFA (1:1:1) добавляли с получением конечной эмульсии KLH/CFA/IFA с требуемыми концентрациями 1X 2,5 мг/мл.

Введение среды-носителя и H16_50kD. Мышей в группах 1-5 подвергали подкожной обработке (SC в поясничную область) в день 0 и день 3. Мыши группы 6 получали положительный контроль через желудочный зонд (PO) в период, соответствующий дням 1-9. Введение циклоспорина А (CsA, Tokyo Chemical Industry) (0,5% метилцеллюлозы (400 сП) в сверхчистой воде) выполняли за 2 часа до инъекций KLH в день 1 и день 7.

Оценка толщины уха и иммунотипов крови. Вырез размером 8 мм (вокруг места инъекции) извлекали из подвергнутого инъекции уха (а также контралатерального у животных группы 1) до подвергания воздействию KLH (в день 7), а затем впоследствии в дни 8, 9 и 10. Животных слегка анестезировали ингаляцией изофлурана приблизительно через 24, 48 и 72 ч после подвергания воздействию KLH. Толщину ушной раковины измеряли с помощью инженерного микрометра.

Образцы цельной крови (150 мкл) собирали у 5 мышей на группу для всех групп в день 0, день 3, день 7, в качестве альтернативы, через яремную вену (за 2-3 ч до введения дозы H16_50kD и/или инъекции KLH) и путем терминального забора крови в день 10. Образцы крови подвергали иммунофенотипированию крови с использованием метода анализа проточной цитометрии (CD45/CD3/CD4/CD25/FoxP3). Определяли относительный процент Т-клеток CD4+, которые представляют собой клетки Treg (CD25+/FoxP3+), для всех временных точек. Только в день 10 определяли абсолютное количество CD4+ клеток Treg с использованием подсчета лимфоцитов с помощью системы Sysmex.

В день 10, в конце окончательной оценки, всех животных из групп 1-6 подвергали анестезии (1-5% изофлураном) и образцы крови (~0,5-1 мл) собирали через брюшную аорту или путем внутрисердечной пункции. Затем животных подвергали обескровливанию через брюшную аорту и сразу же после этого собирали ткани уха (оба уха из группы 1 и уши, инъекцированные KLH, для групп 2-6) для измерений толщины уха.

Как показано на фиг. 17А - фиг. 17В, введение H16_50kD в дозах 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг уменьшало толщину уха по сравнению с отрицательным контролем (только среда-носитель), что указывает на снижение гиперчувствительности замедленного типа. Как показано на фиг. 17С, относительный процент Т-

клеток CD4⁺ в популяции клеток CD25⁺FoxP3⁺ увеличился по сравнению с отрицательным контролем (только среда-носитель) и положительным контролем (циклоспорин А) при введении H16_50kD в дозе 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг соответственно.

Как показано на фиг. 18А - 18С, относительный процент клеток Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) в популяции клеток CD45⁺ (фиг. 18А), в популяции клеток TCRβ⁺ (фиг. 18В) и в популяции клеток CD4⁺ (фиг. 18С) увеличился по сравнению с отрицательным контролем (только среда-носитель) и положительным контролем (циклоспорин А) при введении H16_50kD в дозах 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг соответственно. На фиг. 19 также показано, что в конце дня 10 абсолютное количество клеток Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) было выше у мышей после введения H16_50kD в дозах 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг соответственно по сравнению с отрицательным контролем (только среда-носитель) и положительным контролем (циклоспорин А).

Приведенные выше данные демонстрируют, что введение H16_50kD показало терапевтическую активность в модели заболевания (DTH), обусловленную подавлением вторичных ответных реакций на сенсibiliзирующее средство с помощью индуцированных клеток Treg.

Пример 8.

Чтобы охарактеризовать связывание конъюгата IL-2 H16_50kD (конъюгат, используемый в примере 7) и лиганда IL2 человека с формами рецептора IL2-альфа и рецептора IL2-бета человека, мыши и яванского макака, Fc-меченые рецепторы IL2 были захвачены на сенсорный чип, покрытый белком А, а связывание лиганда H16_50kD и IL2 человека с рецепторами измеряли с помощью биосенсорной системы Biacore SPR. Поверхность без рецептора (только белок А) использовали в качестве референсной поверхности.

Захват Fc-меченых рецепторов сенсорными чипами, покрытыми белком А. Белок А связывали с сенсорным чипом С1 с использованием стандартного связывания с амином, как описано в руководстве Biacore. Каждый лиофилизированный образец Fc-рецептора растворяли до 0,25 мкг/мл, затем разбавляли 1/100 для захвата на поверхности с белком А. Время захвата варьировалось для создания поверхностей различной плотности от ~ 300 до 1000 RU для кинетических исследований. Был проведен дополнительный эксперимент с использованием поверхностей с высокой плотностью для бета-рецепторов человека и яванского макака. Такие рецепторы были захвачены при ~8000 и ~13000 RU соответственно.

Связывание IL2 и H16_50KD с поверхностями альфа-рецепторов человека, мыши и яванского макака. Образцы IL2 и H1650KD тестировали в отношении связывания с поверхностями альфа-рецепторов человека, мыши и яванского макака с применением серии 2-кратных концентраций от 0,7 до 200 нМ. Данные ответа обрабатывали путем вычитания сигналов от референсной поверхности без рецептора, а также среднего значения введений буфера с использованием Scrubber-2 (Biologic Software Pty Ltd). Восемь наборов данных для каждого тестового образца в целом соответствовали модели взаимодействия 1:1, включая шаг для массового переноса.

Связывание IL2 и H1650KD с поверхностями бета-рецепторов человека и яванского макака. Образцы IL2 и H16_50KD тестировали в отношении связывания с поверхностями бета-рецепторов человека и яванского макака с применением серии 2-кратных концентраций от 16 нМ до 4 мкМ. Данные относительно ответа обрабатывали путем вычитания сигналов из значений для референсной поверхности без рецептора, а также среднего значения для введений буфера. Четыре набора данных для IL2, взаимодействующего с поверхностями бета-рецепторов человека и яванского макака, в целом соответствовали модели взаимодействия 1:1. Не наблюдалось связывания H16_50KD с поверхностями бета-рецепторов человека или яванского макака.

Чтобы определить, может ли быть обнаружено какое-либо взаимодействие H16_50KD с поверхностями бета-рецепторов человека и яванского макака, были проведены исследования аддитивного связывания с использованием поверхностей с высокой плотностью каждого рецептора. Для этих тестов сначала анализировали H16_50KD, используя серию 2-кратных концентраций от 23 нМ до 12 мкМ. Никакого специфического взаимодействия в отношении H16_50KD с рецептором бета-R человека или яванского макака не было выявлено даже при концентрации до 12 мкМ. Напротив, значительный ответ при 900 RU и 1700 RU наблюдался для IL2 на поверхностях бета-рецепторов как человека, так и яванского макака соответственно. Связывания IL2 с референсной поверхностью не наблюдалось.

Сущность результатов. В целом IL2 связывался с альфа-формами рецепторов человека, мыши и яванского макака с одинаковой аффинностью ~10 нМ, при этом H16_50KD демонстрировал аффинность к альфа-рецепторам, которая была в 3 раза слабее при ~30 нМ. IL2 связывался с бета-рецептором человека и яванского макака с аналогичной аффинностью ~300 нМ. Не было обнаружено значительного связывания H16_50KD с бета-рецепторами. H16_50KD, по-видимому, представляет собой соединение со значительно сниженной или устраненной аффинностью к бета-рецепторам, поскольку связывание с бета-рецепторами IL2 не обнаруживается даже при высоких концентрациях. В таблице 11 представлены обобщенные результаты относительно констант связывания.

Таблица 11

Константы связывания IL2 и H16_50KD с рецепторами, определенные при 25°C

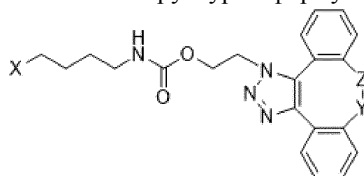
Поверхность	Образец	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (нМ)
h α R	IL2	1,3(8)*e8	1,2(7)	9,29(1)**
h α R	H16_50KD	3,88(1)e6	0,1257(4)	32,41(3)
m α R	IL2	8,92(4)e6	0,0986(5)	11,05(1)
m α R	H16_50KD	1,400(3)e6	0,0748(2)	53,42(7)
r α R	IL2	6,4(2)e7	0,59(2)	9,26(1)
r α R	H16_50KD	2,870(7)e6	0,0751(2)	26,16(3)
h β R	IL2	9,00(4)e5	0,2634(5)	293(1)
h β R	H16_50KD	СВЯЗЫВАНИЯ НЕ ВЫЯВЛЕНО		
r β R	IL2	8,51(2)e5	0,2415(4)	283,8(5)
r β R	H16_50KD	СВЯЗЫВАНИЯ НЕ ВЫЯВЛЕНО		

Примечание: Значения в скобках представляют собой стандартное отклонение от соответствия 8 или 4 наборам данных, представленным для последней значащей цифры. Например, 1,3(8)e8 соответствует $(1,3 \pm 0,8)e8$. Значения скорости ассоциации IL2 с h α R очень высоки и, следовательно, массовый перенос ограничен. Это приводит к большей погрешности. Однако, поскольку скорости ассоциации и диссоциации характеризуются высокой степенью корреляции, соотношение кинетических параметров для сильно ограниченных данных относительно массового переноса по-прежнему обеспечивает точное значение равновесной константы диссоциации (KD).

Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления предусмотрены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно применять при осуществлении настоящего изобретения на практике. Подразумевается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквиваленты охвачены ею.

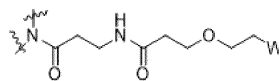
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат IL-2 для лечения аутоиммунного заболевания, содержащий полипептид IL-2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в полипептиде IL-2 заменен структурой формулы (I):

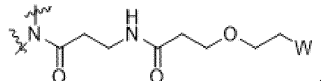


(I),

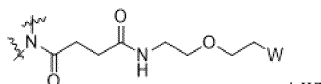
где Z представляет собой CH_2 и Y представляет собой



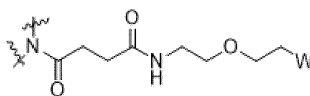
Y представляет собой CH_2 и Z представляет собой



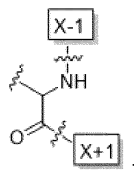
Z представляет собой CH_2 и Y представляет собой



; или



Y представляет собой CH_2 и Z представляет собой
 W представляет собой группу PEG, имеющую молекулярную массу приблизительно 50 кДа;
 X имеет структуру



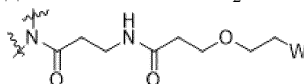
X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку;

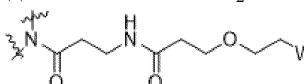
при этом когда полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, по меньшей мере один аминокислотный остаток, замененный структурой формулы (I), расположен в полипептиде IL-2 в положении, выбранном из K8, H15, L18, D19, N25, N87, E99 и N118; или

когда полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, по меньшей мере один аминокислотный остаток, замененный структурой формулы (I), расположен в полипептиде IL-2 в положении, выбранном из K9, H16, L19, D20, N26, N88, E100 и N119.

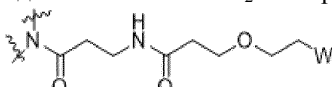
2. Конъюгат IL-2 по п.1, где Z представляет собой CH_2 и Y представляет собой



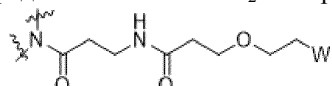
3. Конъюгат IL-2 по п.1, где Y представляет собой CH_2 и Z представляет собой



4. Конъюгат IL-2 по п.1, где Z представляет собой CH_2 и Y представляет собой



5. Конъюгат IL-2 по п.1, где Y представляет собой CH_2 и Z представляет собой



6. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой K8; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой K9.

7. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой H15; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой H16.

8. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой L18; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой L19.

9. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой D19; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой D20.

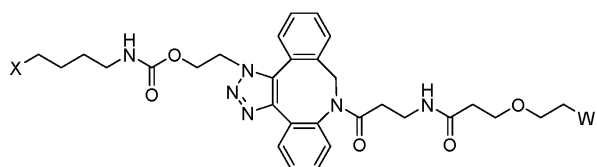
10. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой N25; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой N26.

11. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой N87; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой N88.

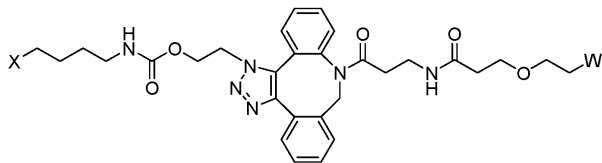
12. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой E99; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой E100.

13. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-5, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и положение представляет собой N118; или полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и положение представляет собой N119.

14. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-13, где структура формулы (I) имеет структуру формулы (II) или формулы (III):

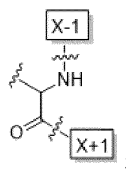


(II)



(III)

где W представляет собой группу PEG, имеющую молекулярную массу приблизительно 50 кДа;
X имеет структуру:

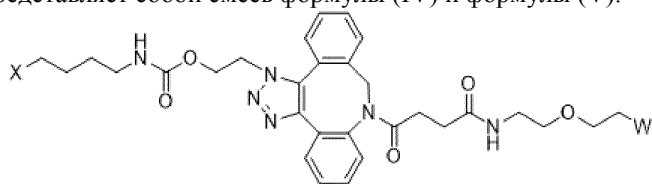


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

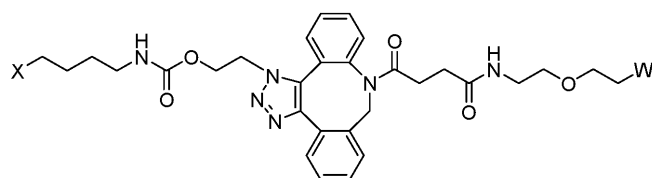
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов II-2 по п.14 и фармацевтически приемлемый наполнитель, где смесь содержит конъюгаты II-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (II), и конъюгаты II-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (III).

16. Конъюгат II-2 по любому из пп.1-13, где структура формулы (I) имеет структуру формулы (IV) или формулы (V) или представляет собой смесь формулы (IV) и формулы (V):

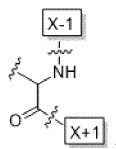


(IV)



(V)

где W представляет собой группу PEG, имеющую молекулярную массу приблизительно 50 кДа;
X имеет структуру:

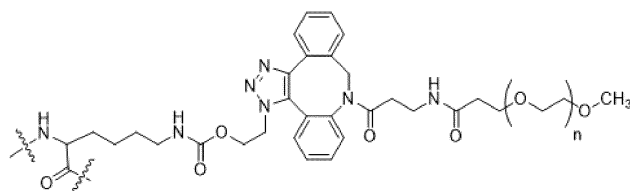


X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; и

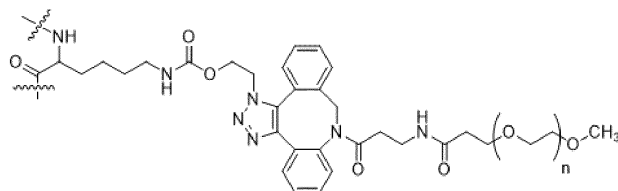
X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов II-2 по п.16 и фармацевтически приемлемый наполнитель, где смесь содержит конъюгаты II-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (IV), и конъюгаты II-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (V).

18. Конъюгат II-2 по любому из пп.1-13, где структура формулы (I) имеет структуру формулы (X) или формулы (XI):



(X)



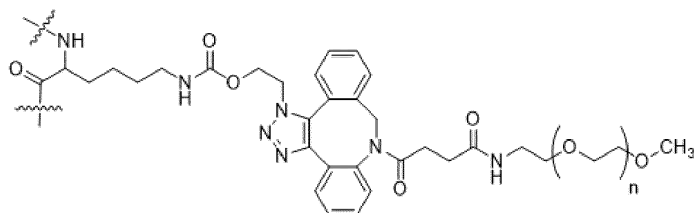
(XI)

где n обозначает целое число, такое, что молекулярная масса группы PEG составляет приблизительно 50 кДа; и

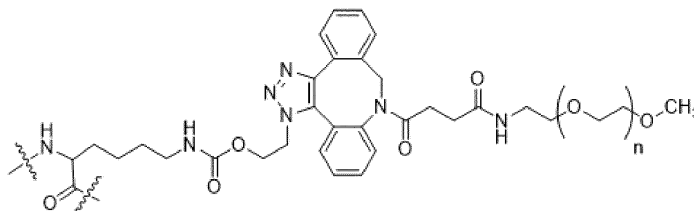
волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3 или 4, которые не заменены.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов IL-2 по п.18 и фармацевтически приемлемый наполнитель, где смесь содержит конъюгаты IL-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (X) и конъюгаты IL-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (XI).

20. Конъюгат IL-2 по любому из пп.1-13, где структура формулы (I) имеет структуру формулы (XII) или формулы (XIII):



(XII)



(XIII)

где n обозначает целое число, такое, что молекулярная масса группы PEG составляет приблизительно 50 кДа; и

волнистыми линиями показаны ковалентные связи с аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 3 или 4, которые не заменены.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов IL-2 по п.20 и фармацевтически приемлемый наполнитель, где смесь содержит конъюгаты IL-2, в которых структура формулы (I) имеет структуру формулы (XII), и конъюгаты IL-2, в котором структура формулы (I) имеет структуру формулы (XIII).

22. Способ размножения и/или активации клеток Treg у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21.

23. Способ по п.22, где нуждающийся в этом субъект представляет собой субъект с аутоиммунным заболеванием.

24. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 в по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21.

25. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(а) определение скорости оседания эритроцитов (ESR) у субъекта и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21, если определено, что ESR является аномальной.

26. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту, у которого определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR), терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21.

27. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

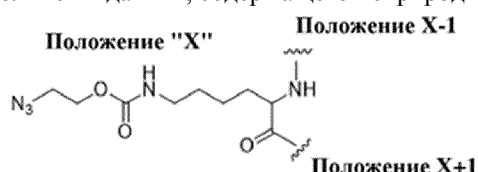
(a) определение концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови субъекта и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21, если определено, что концентрация С-реактивного белка (CRP) в крови субъекта является аномальной.

28. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту, у которого определено наличие аномальной скорости оседания эритроцитов (ESR), терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп.1-14, 16, 18 и 20 или фармацевтической композиции по любому из пп.15, 17, 19 и 21.

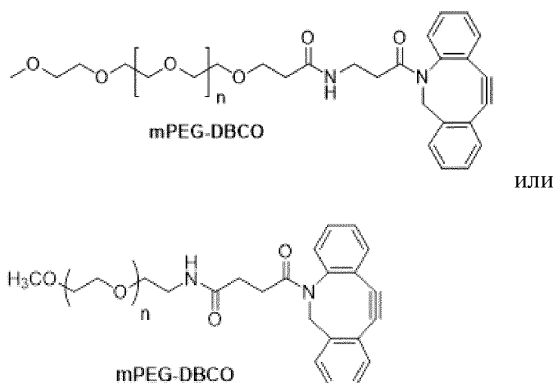
29. Способ получения конъюгата IL-2, включающий:

осуществление реакции полипептида IL-2, содержащего неприродную аминокислоту формулы



в положении X полипептида IL-2, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 4, при этом по меньшей мере один аминокислотный остаток в полипептиде IL-2 заменен неприродной аминокислотой, положение X-1 указывает точку присоединения к предыдущему аминокислотному остатку; положение X+1 указывает точку присоединения к следующему аминокислотному остатку,

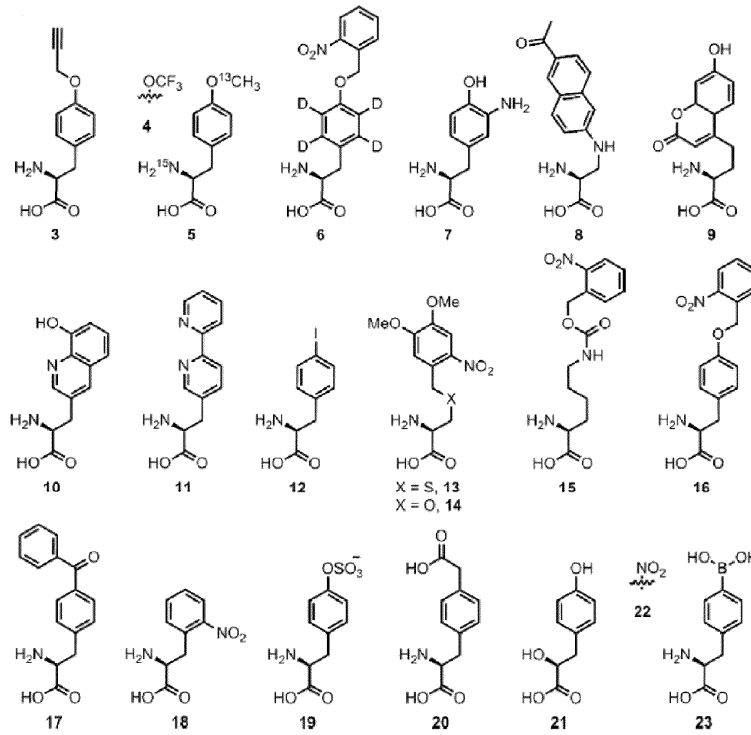
с mPEG-DBCO формулы



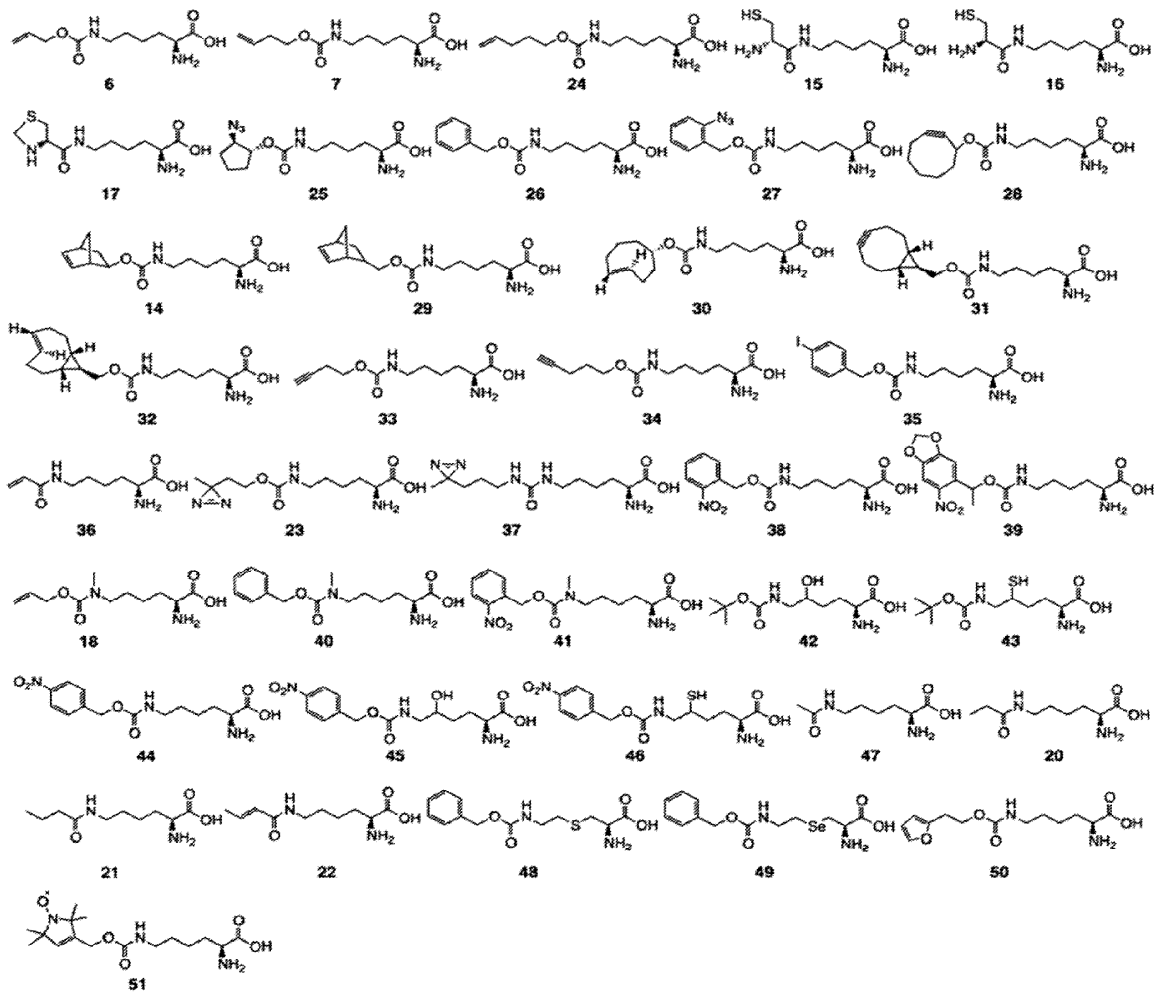
где n является таким, что mPEG-DBCO содержит PEG, имеющий молекулярную массу приблизительно 50 кДа, с получением таким образом конъюгата IL-2,

при этом положение X выбрано из K8, H15, L18, D19, N25, N87, E99 и N118, относящихся к положениям аминокислот в SEQ ID NO: 3,

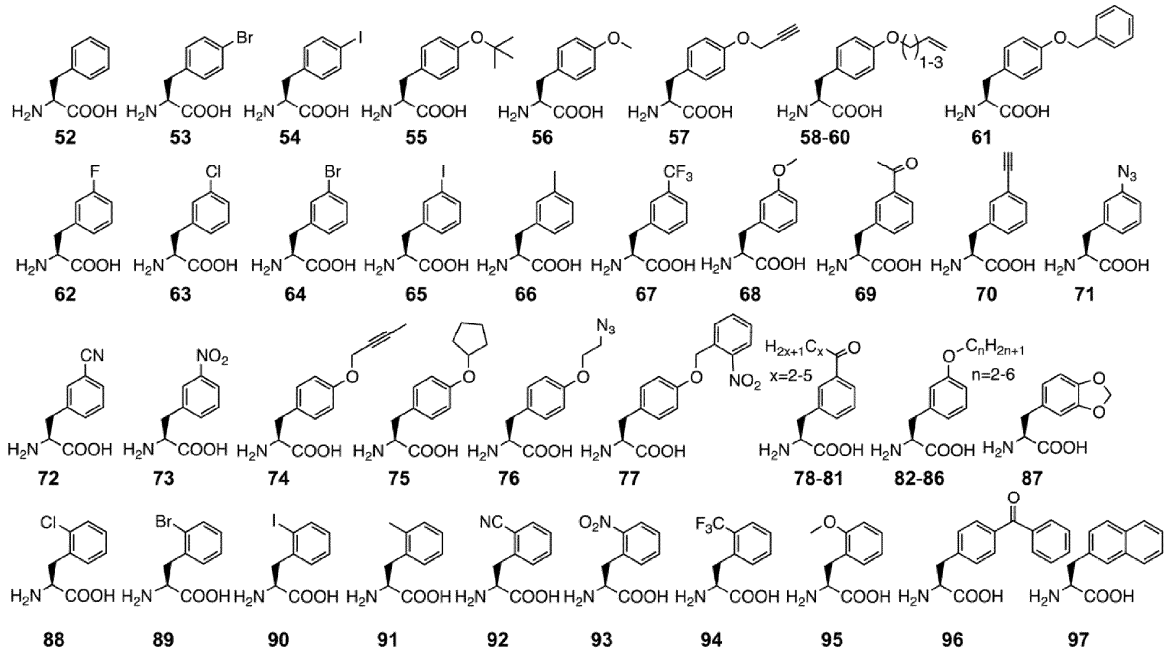
или положение X выбрано из K9, H16, L19, D20, N26, N88, E100 и N119, относящихся к положениям аминокислот в SEQ ID NO: 4.



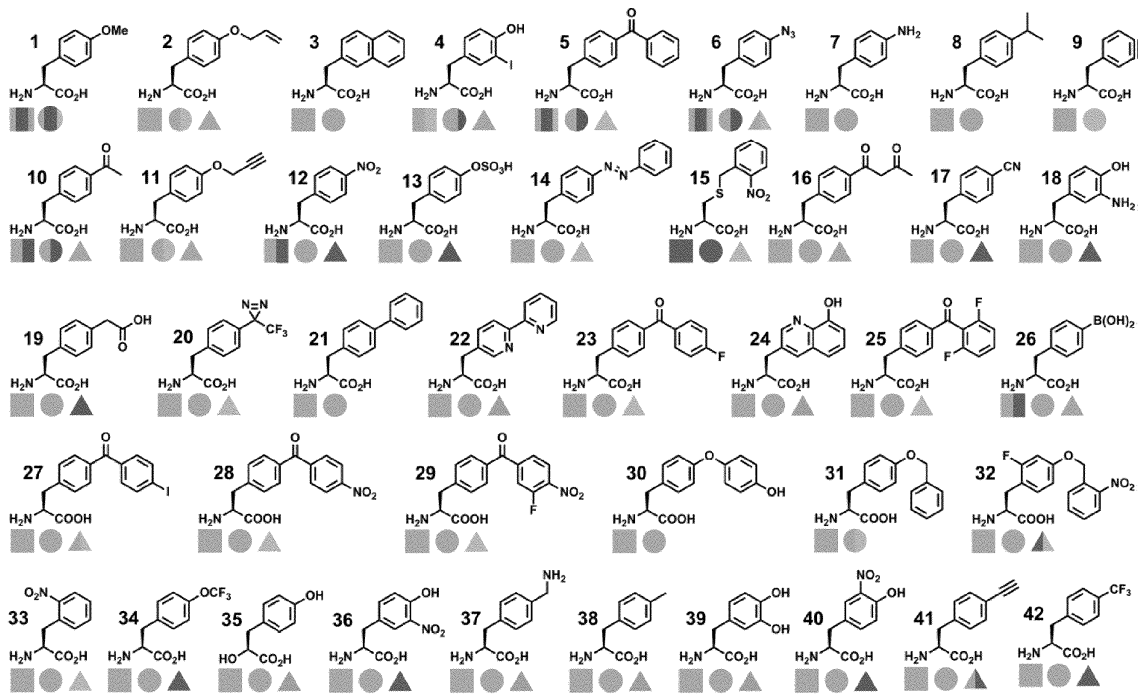
Фиг. 1



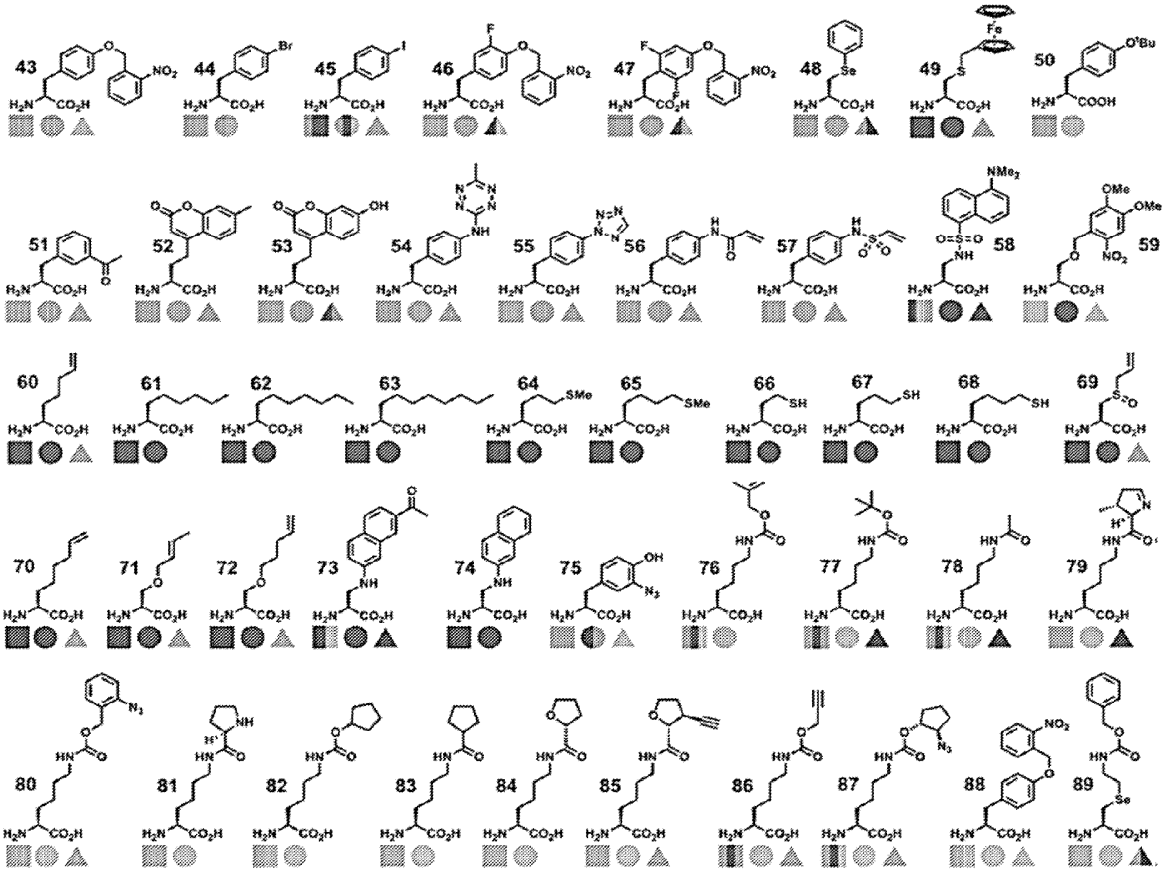
Фиг. 2А



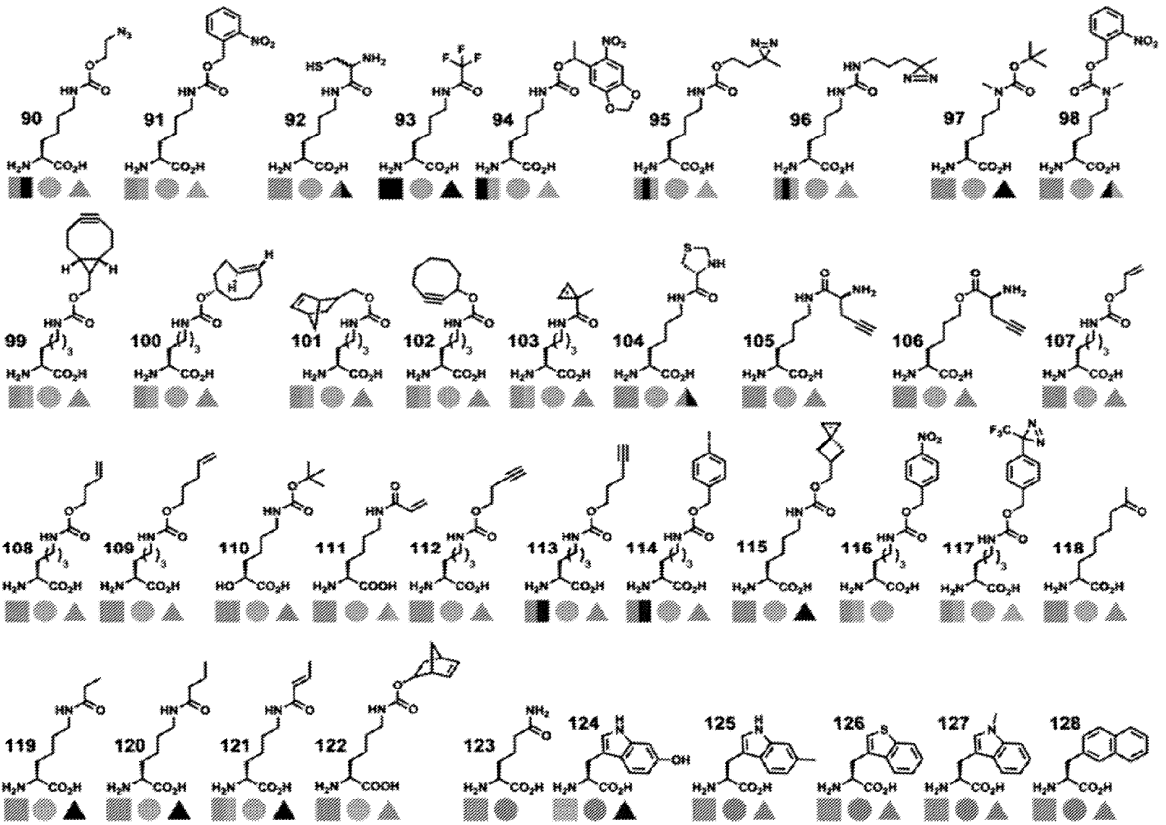
Фиг. 2В



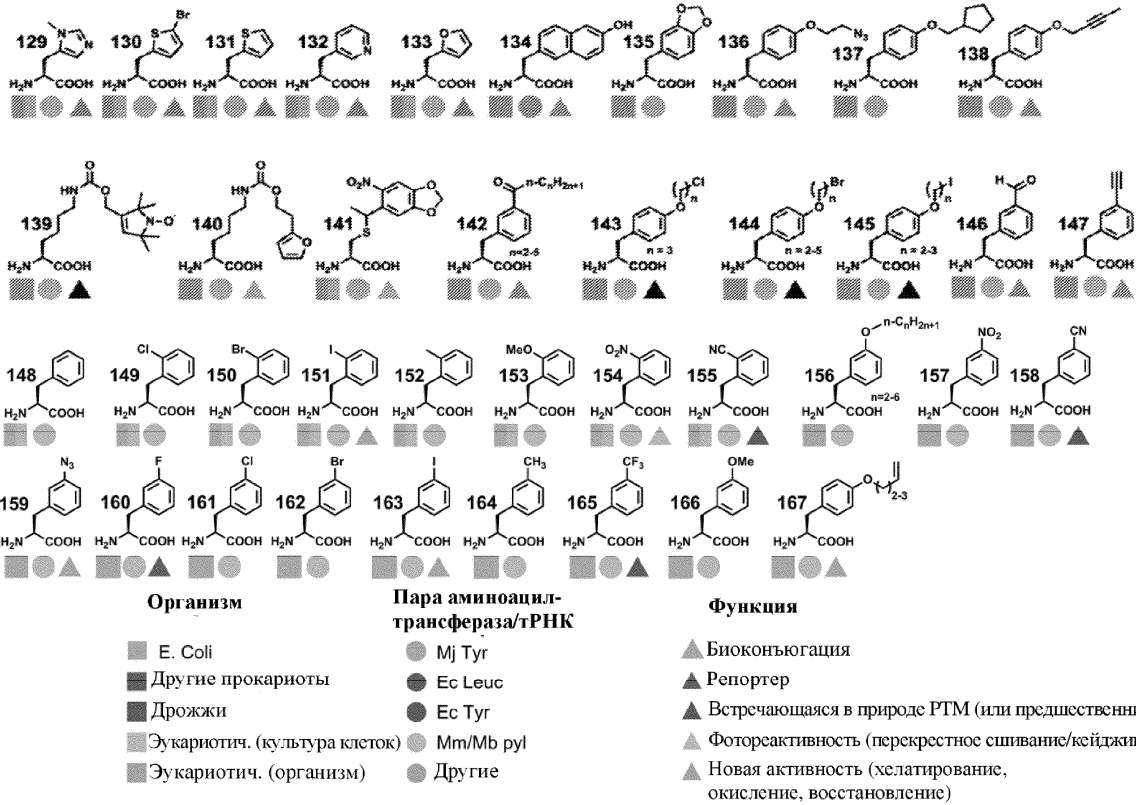
Фиг. 3А



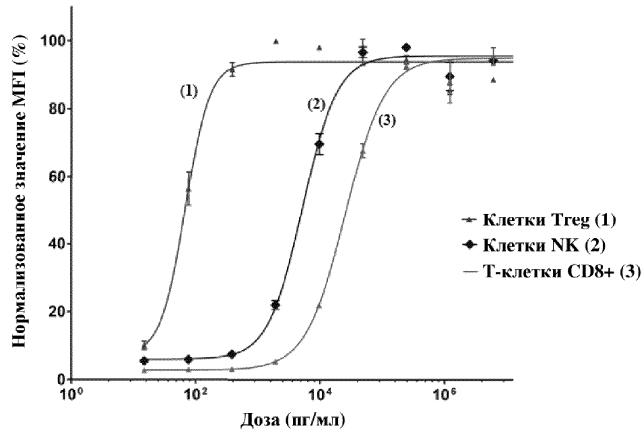
Фиг. 3В



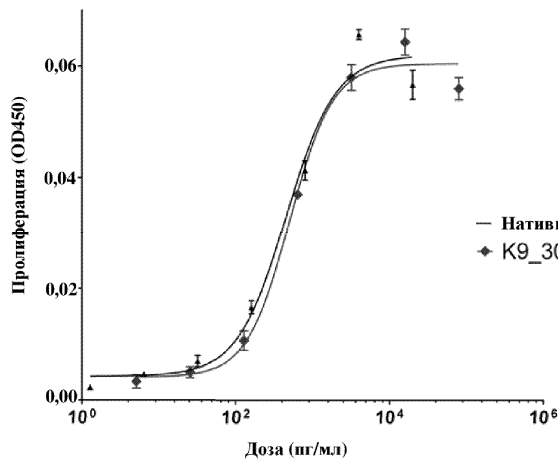
Фиг. 3С



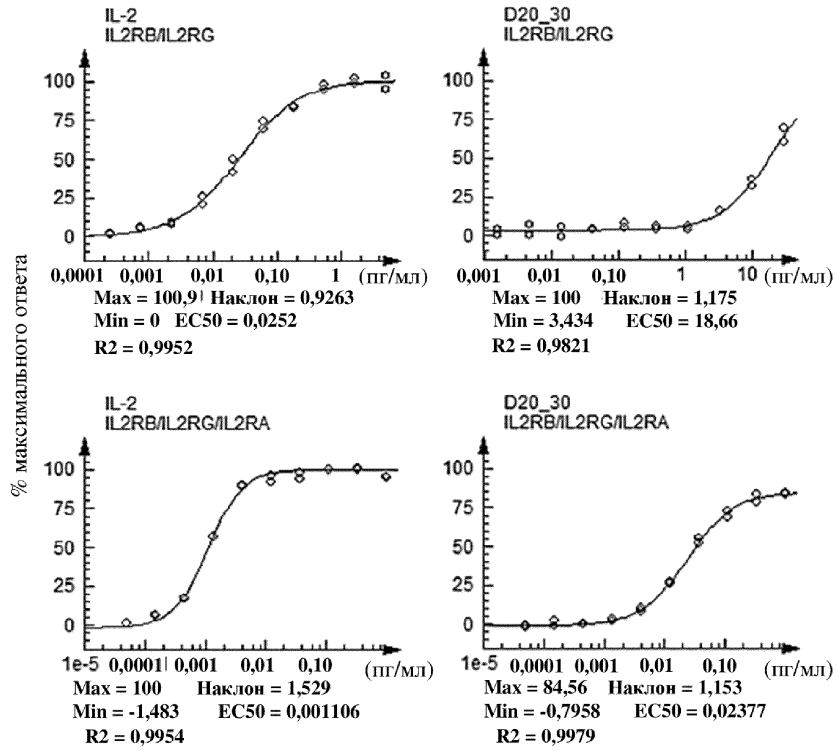
Фиг. 3D



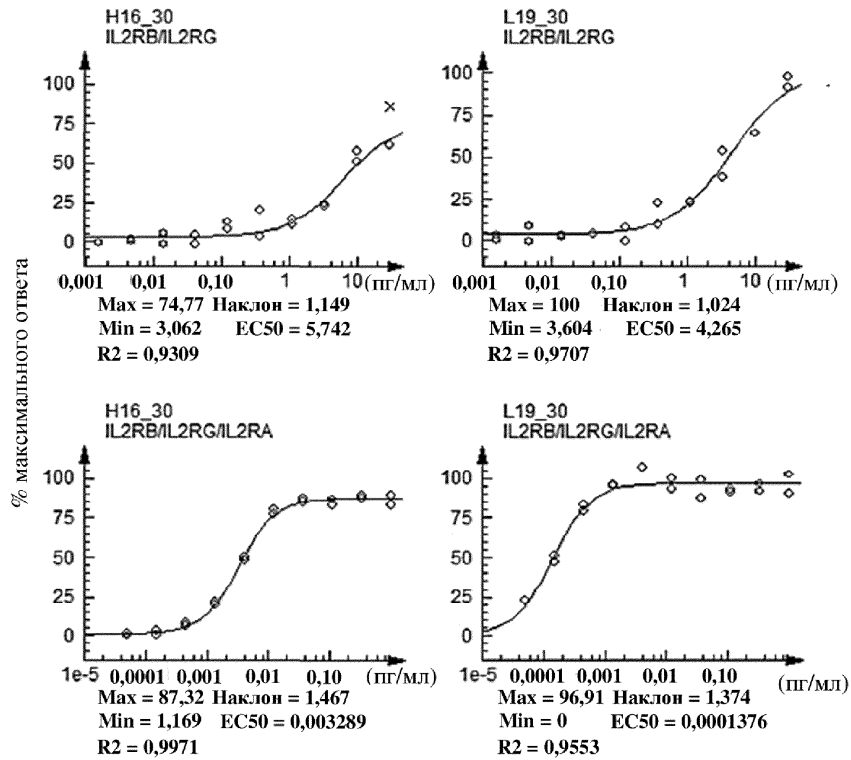
Фиг. 4A



Фиг. 4B

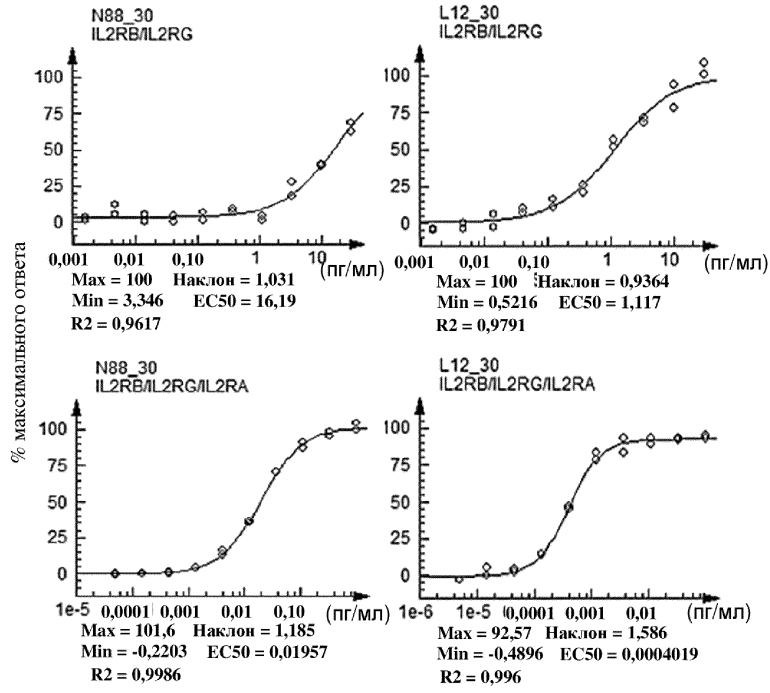


Фиг. 5А

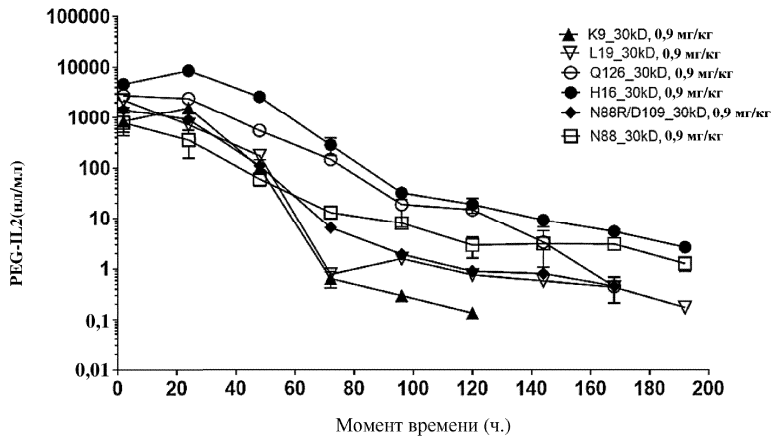


Доза (пг/мл)

Фиг. 5В



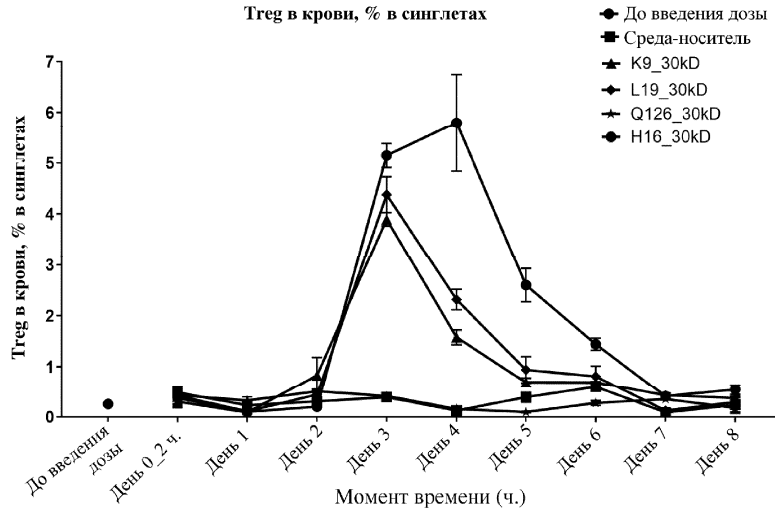
Фиг. 5С



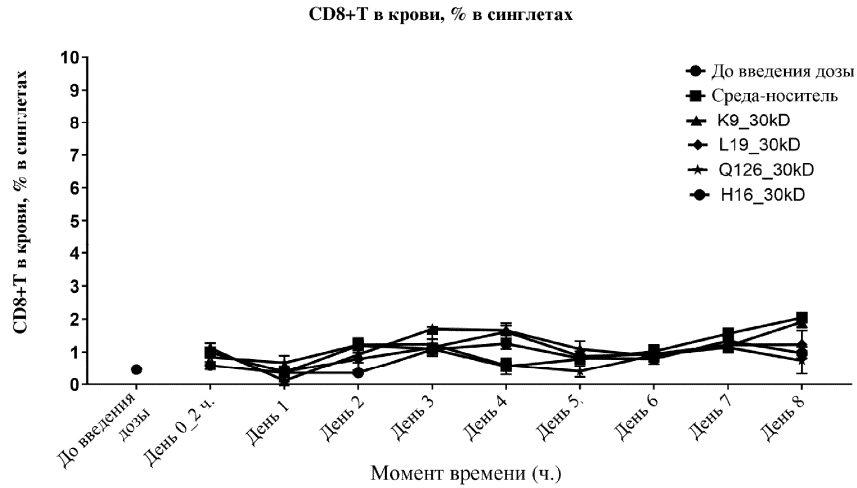
Фиг. 6



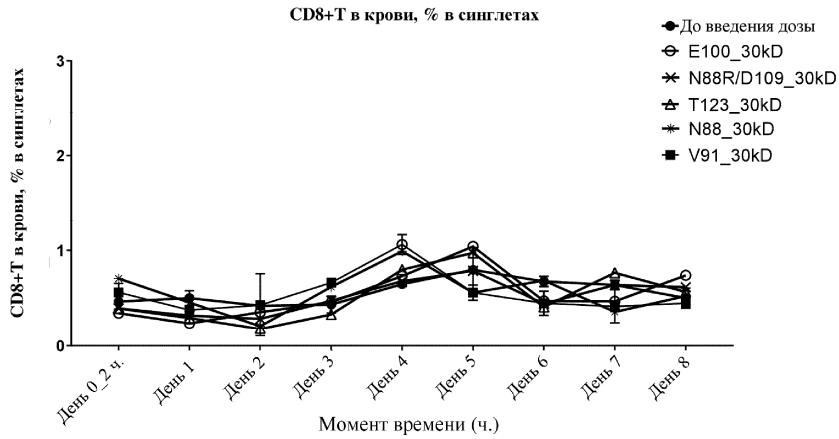
Фиг. 7



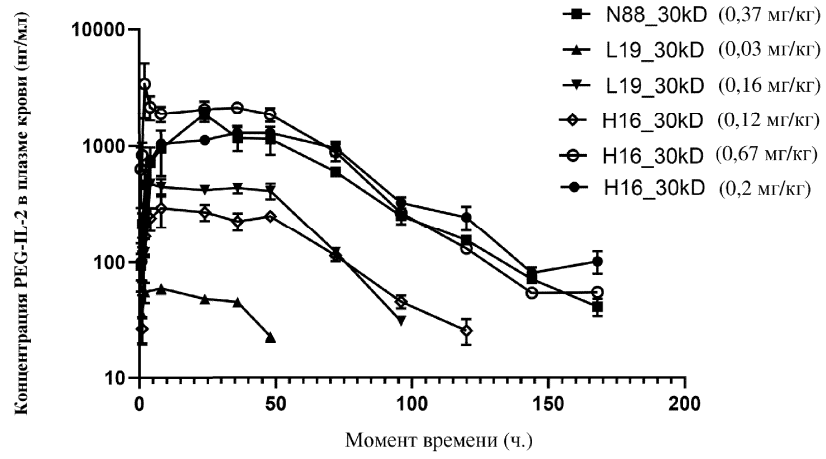
Фиг. 8



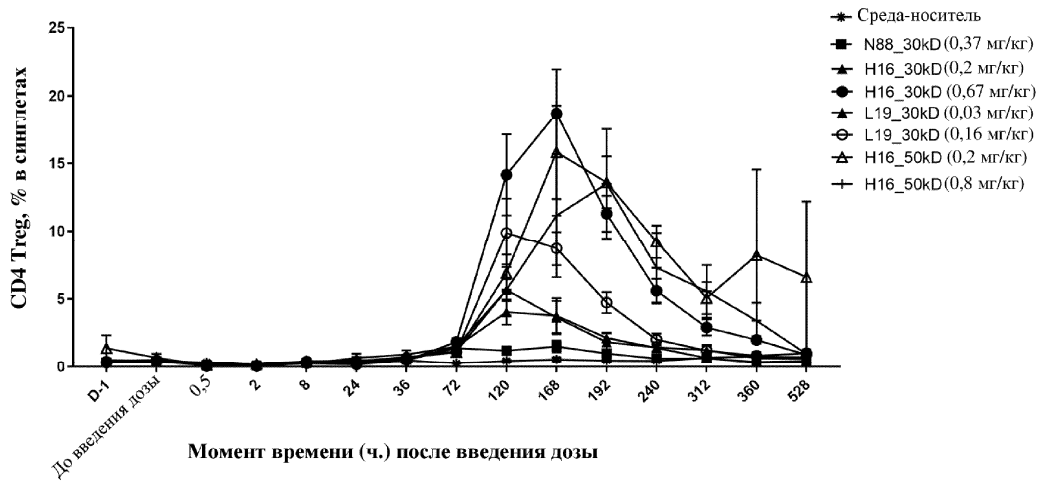
Фиг. 9А



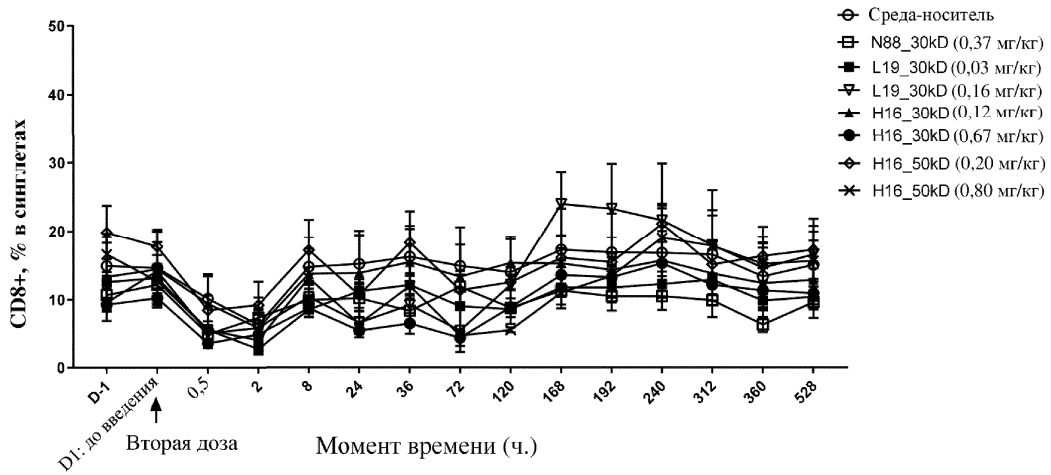
Фиг. 9В



Фиг. 10

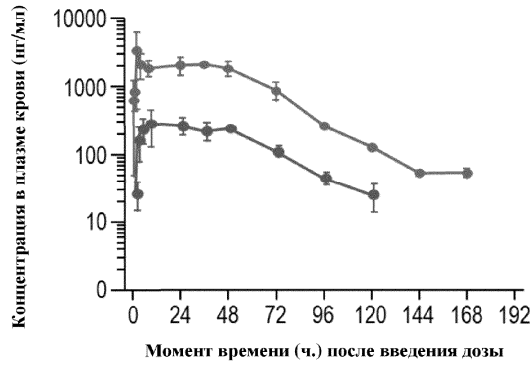


Фиг. 11

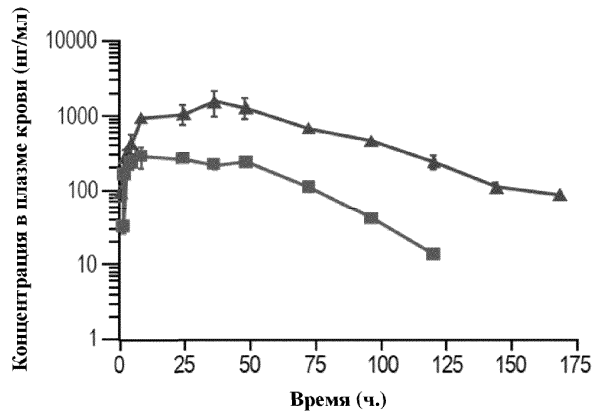


Фиг. 12

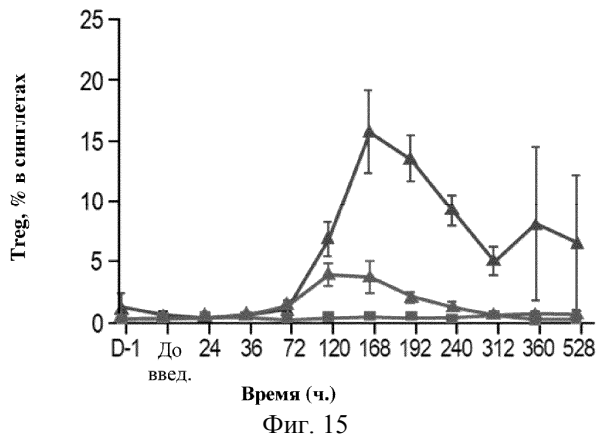
047903



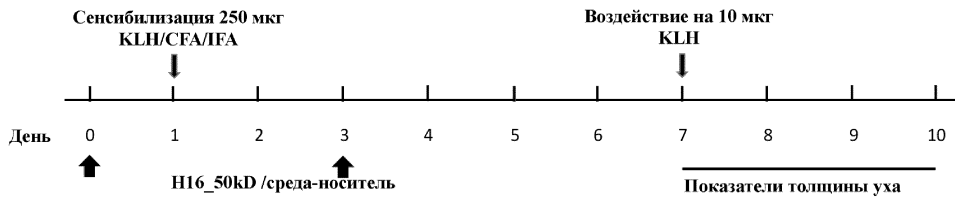
Фиг. 13



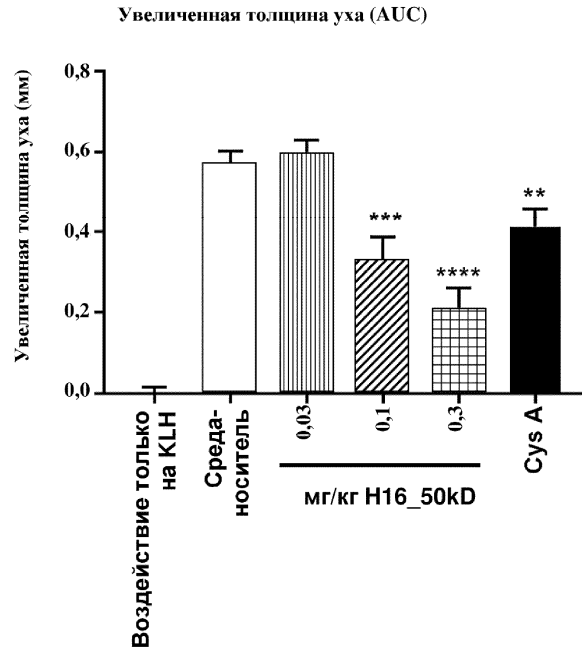
Фиг. 14



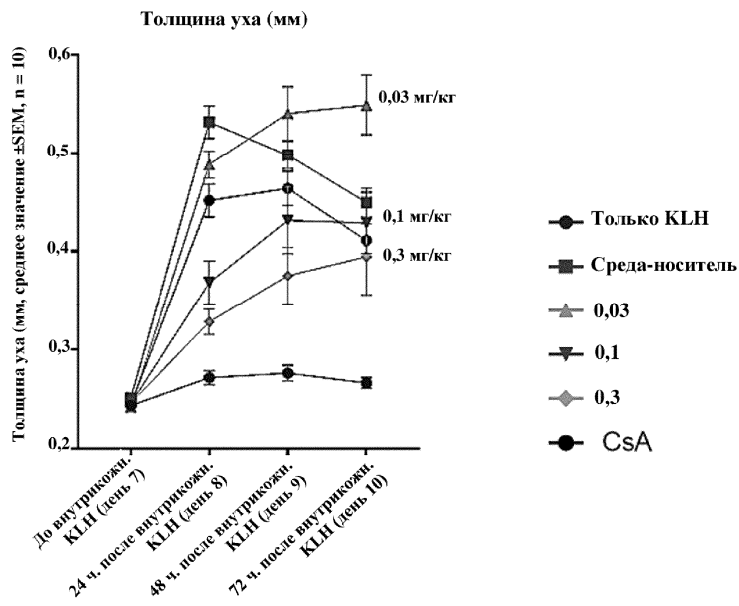
Фиг. 15



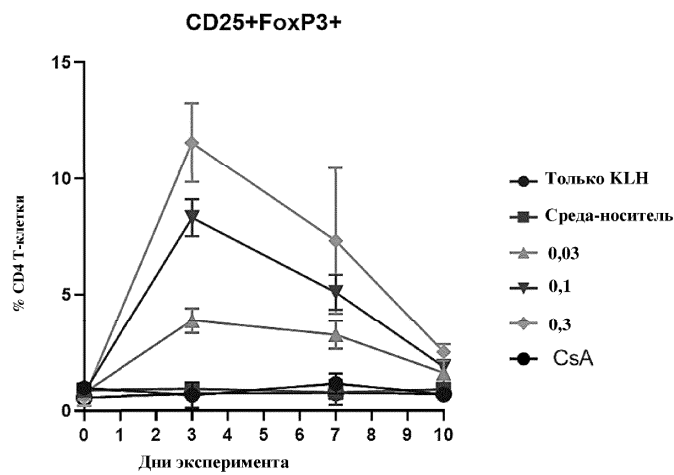
Фиг. 16



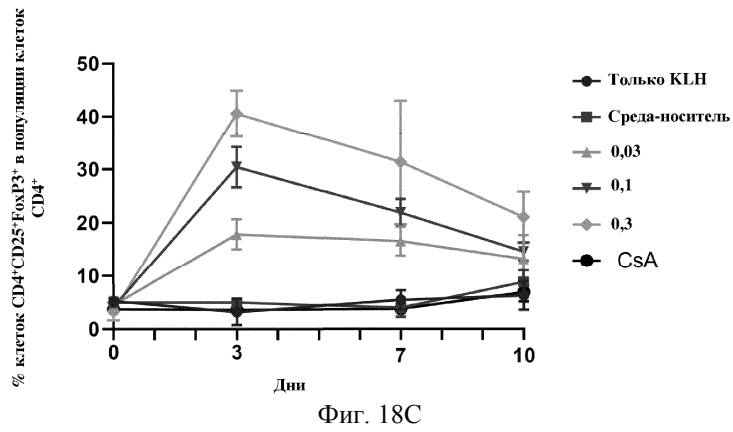
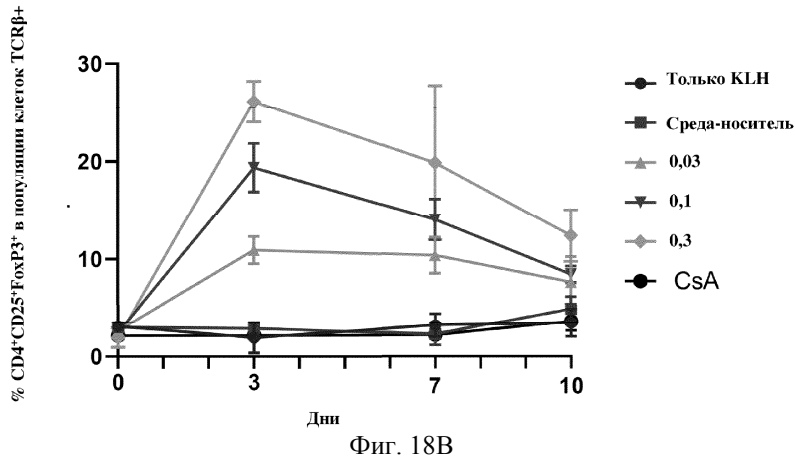
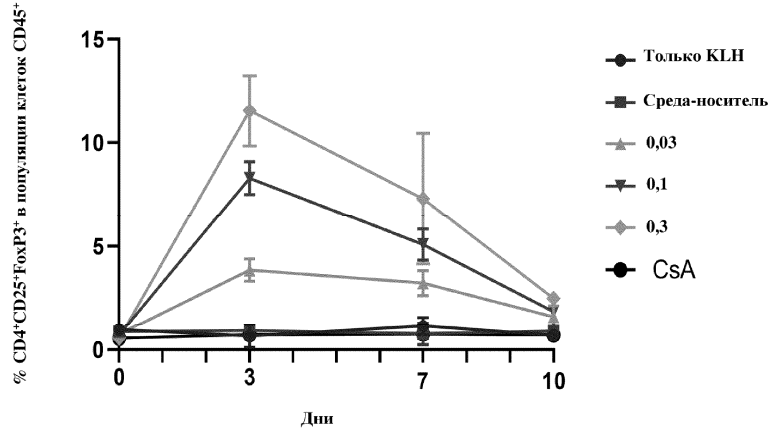
Фиг. 17А



Фиг. 17В

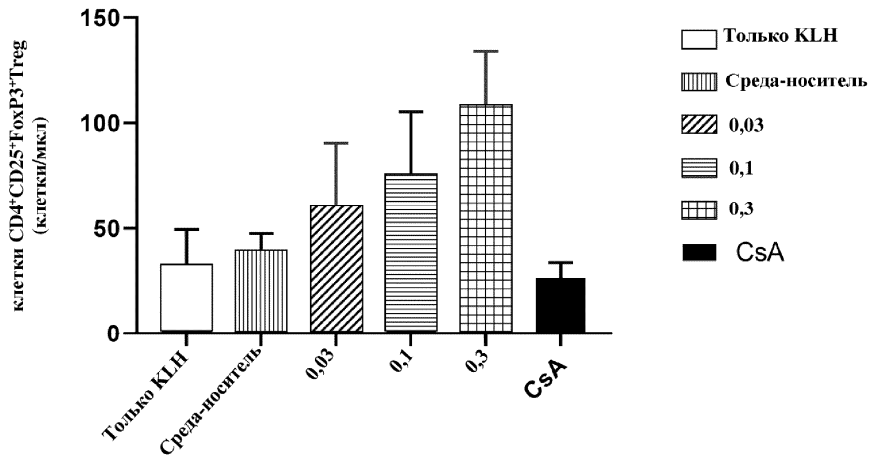


Фиг. 17С



047903

День 10



Фиг. 19

