

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037083**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.02.03**

**(51)** Int. Cl. *A61K 45/00* (2006.01)  
*C07K 1/00* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201390697**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.11.11**

---

**(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ КОНЪЮГАТ, ВКЛЮЧАЮЩИЙ IL-2 И  
ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИМЕРЫ**

---

**(31)** 61/413,236

**(56)** US-A1-20040136952  
US-A1-20050186174  
US-A-4705848  
US-A1-20090263382  
US-A-6034072

**(32)** 2010.11.12

**(33)** US

**(43)** 2013.08.30

**(86)** PCT/US2011/060408

**(87)** WO 2012/065086 2012.05.18

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НЕКТАР ТЕРАПЬЮТИКС (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Боссард Мэри Дж., Али Шери Ф., Лю  
Сиаофен, Чарич Дебора Х., Заппе  
Харольд, Ванг Юйцзюнь, Хуан  
Цзицай (US)**

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

---

**(57)** Изобретение относится к иммуномодулирующему конъюгату, который включает IL-2, соединенный посредством поддающейся разрыву связи с одним или несколькими водорастворимыми полимерами. Изобретение также относится к фармацевтической композиции для модуляции иммунного ответа у пациента с раковым заболеванием, содержащей заявленный конъюгат; к способу доставки заявленного конъюгата посредством введения индивидууму указанной композиции; к способу получения заявленного конъюгата.

**B1**

**037083**

**037083**

**B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

В соответствии с § 119 (е) Патентного закона США раздела 35 настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/413236, поданной 12 ноября 2010 года, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Область изобретения

Среди прочего, один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, в целом, относятся к конъюгатам, содержащим компонент IL-2 (т.е. компонент, по меньшей мере, с некоторой активностью, подобной человеческому IL-2) и полимер. К тому же настоящее изобретение относится (среди прочего) к композициям, содержащим конъюгаты, способам синтеза конъюгатов и способам введения композиции.

### Предпосылки изобретения

У здоровых людей иммунная система может различать здоровые клетки и раковые клетки. После идентификации данной клетки как раковой иммунная система, как правило, элиминирует ее. Таким образом, когда иммунная система разрушается или поражена, типы рака могут развиваться в результате неспособности поврежденной иммунной системы различать и затем элиминировать, раковые клетки. В случае пациента, страдающего от рака, введение пациенту иммуномодуляторного белка может помочь (по меньшей мере, частично) вернуть иммунную систему пациента в нормальное состояние, таким образом, что возвращается способность иммунной системы элиминировать раковые клетки. Следовательно, рак можно замедлить или даже элиминировать.

Одним таким иммуномодуляторным белком, применяемым в лечении пациентов, страдающих от конкретных типов рака, является интерлейкин-2. Интерлейкин-2 (IL-2) представляет собой естественный цитокин с активностью как стимулятора клеток натуральных киллеров (NK-клеток), так и индуктора пролиферации Т-клеток. В негликозилированной форме IL-2 имеет молекулярную массу приблизительно 15300 Да (хотя IL-2 обнаруживается *in vivo* в различно гликозилированных формах).

Коммерчески доступный продукт негликозилированного человеческого рекомбинантного IL-2, альдеслейкин (доступен под торговой маркой PROLEUKIN® как дез-аланил-1, серин-125 человеческий интерлейкин-2 от Prometheus Laboratories Inc., Сан-Диего, Калифорния), был одобрен для введения пациентам, страдающим от метастатического рака почки и метастатической меланомы. IL-2 также был предложен для введения пациентам, страдающим или зараженным вирусом гепатита С (HCV), вирусом иммунодефицита человека (HIV), острым миелоидным лейкозом, неходжкинской лимфомой, Т-клеточной лимфомой кожи, ювенильным ревматоидным артритом, атопическим дерматитом, раком молочной железы и раком мочевого пузыря.

Однако даже рекомендованные дозы альдеслейкина могут вызывать тяжелые побочные эффекты, в том числе острый респираторный дистресс-синдром (CLS) и нарушение функции нейтрофилов. С учетом возможности этих тяжелых побочных эффектов, и поскольку рекомендованный цикл лечения включает внутривенную инфузию в течение пятнадцати минут каждые восемь часов в четырнадцати дозах, введение альдеслейкина происходит в условиях клиники. Более того, коммерческий состав альдеслейкина включает присутствие додецилсульфата натрия, вещества, которое, по-видимому, требуется для поддержания оптимальной активности путем конформационной стабильности. См. Arakawa et al. (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:583-587.

Были предприняты попытки устранения токсичности, связанной с IL-2. В одном подходе предпринимали подходы, связанные с составлением. См., например, патент США № 6706289 и публикацию международной заявки на патент WO 02/00243 и WO 99/60128. В других подходах были предложены конкретные конъюгаты IL-2. См., например, патенты США № 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502.

Однако несмотря на эти подходы остается потребность в конъюгатах IL-2.

Среди прочего, один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, вследствие этого, направлены на такие конъюгаты, а также композиции, содержащие конъюгаты, и связанные с ними способы, описываемые в данном документе, которые, как полагают, являются новыми и не вытекают полностью из уровня техники.

В соответствии с этим в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривается конъюгат, причем конъюгат содержит остаток компонента IL-2, ковалентно прикрепленного к водорастворимому полимеру.

Более конкретно, предусматривается иммуномодулирующий конъюгат, включающий IL-2, содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность, гомологичную на 95% любой из указанных последовательностей, причем IL-2 ковалентно соединен посредством поддающейся разрыву связи с одним или несколькими водорастворимыми полимерами, каждый из которых имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 85 кДа, при этом поддающаяся разрыву связь содержит сложноэфирную группу, выбранную из сложного эфира карбоновой кислоты, сложного эфира фосфорной кислоты, тиолового сложного эфира и сложного ортоэфира, или же представляет собой карбаматную связь, причем в условиях *in vivo* указанная связь поддается разрыву с высвобождением одного или нескольких водорастворимых полимеров.

Согласно настоящему изобретению конъюгат может содержать остаток компонента IL-2, ковалент-

но прикрепленного к водорастворимому полимеру, где компонент IL-2 является предшественником компонента IL-2.

Согласно настоящему изобретению конъюгат может содержать остаток компонента IL-2, ковалентно прикрепленного к водорастворимому полимеру, где компонент IL-2 не является предшественником компонента IL-2.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривается фармацевтическая композиция для модуляции иммунного ответа у пациента с раковым заболеванием, содержащая вышеуказанный конъюгат согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривается способ доставки конъюгата, содержащего остаток IL-2, нуждающемуся в этом индивидууму, причем способ включает этап введения пациенту вышеуказанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривается способ получения конъюгата по настоящему изобретению, включающий приведение в контакт IL-2 с водорастворимым полимером, имеющим среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 85 кДа, в условиях, подходящих для образования поддающейся разрыву связи, причем IL-2 представляет собой белок, содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность, гомологичную на 95% любой из указанных последовательностей.

При этом в вышеуказанном способе поддающаяся разрыву связь представляет собой связь, содержащую сложноэфирную группу, выбранную из сложного эфира карбоновой кислоты, сложного эфира фосфорной кислоты, тиолового сложного эфира и сложного ортоэфира, или же представляет собой карбаматную связь.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена последовательность ДНК и получаемая аминокислотная последовательность гена, дополнительно описанного в примере 1;

фиг. 2.1 является изображением типичной хроматограммы после катионообменной хроматографии [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2], осуществленной после процедуры, изложенной в примере 2;

фиг. 2.2 - изображением хроматограммы после анализа обращенно-фазовой HPLC [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 2;

фиг. 2.3 представляет собой график профилей расщепления различных конъюгатов, полученных в соответствии с процедурой, изложенной в примере 2;

фиг. 3.1 является изображением типичной хроматограммы после катионообменной хроматографии [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], осуществленной после процедур, изложенных в примере 3;

фиг. 3.2 - изображением хроматограммы после анализа обращенно-фазовой HPLC [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 3;

фиг. 3.3 - изображением результатов анализа MALDI-TOF различных конъюгатов, полученных в соответствии с процедурами, изложенными в примере 3;

фиг. 4.1 - изображением типичной хроматограммы после катионообменной хроматографии [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2], осуществленной после процедур, изложенных в примере 4;

фиг. 4.2 - изображением хроматограммы после анализа обращенно-фазовой HPLC [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 4;

фиг. 5 - изображением хроматограммы после катионообменной хроматографии [mPEG2-ru-40K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 5;

фиг. 6 - изображением хроматограммы после катионообменной хроматографии [mPEG2-ru-4K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 6;

на фиг. 7 показан график пролиферации клеток CTLL-2 в ответ на альдеслейкин и стабильный [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 11. Точки на графике обозначают один эксперимент при определениях в трех повторностях. "Усы" представляют стандартную ошибку среднего;

на фиг. 8 - график пролиферации клеток CTLL-2 в ответ на альдеслейкин, высвобожденные и невысвобожденные [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] и [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], как дополнительно описано в примере 11. Точки на графике обозначают один эксперимент при определениях в трех повторностях. "Усы" представляют стандартную ошибку среднего;

на фиг. 9 - график кривых концентрация-время после однократной инъекции у мышей, как дополнительно описано в примере 12;

на фиг. 10 - график общей площади поражения (мм<sup>2</sup>) для нескольких тестируемых соединений, как дополнительно описано в примере 13;

фиг. 11А и 11В представляют собой графики, показывающие кривые время-развитие опухоли для тестируемых продуктов при различных схемах введения, как дополнительно описано в примере 14.

#### Подробное описание изобретения

Перед подробным описанием одного или нескольких вариантов осуществления изобретения следу-

ет понимать, что настоящее изобретение не ограничивается определенными полимерами, методиками синтеза, компонентами IL-2 и т.п., которые как таковые могут варьировать.

Следует отметить, что применяемые в настоящем описании и предусматриваемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, кроме тех случаев, когда контекст явно предписывает обратное. Таким образом, например, ссылка на "полимер" включает один полимер, а также два или более одинаковых или различных полимеров, ссылка на "необязательный наполнитель" относится к одному необязательному наполнителю, а также к двум или более одинаковым или различным необязательным наполнителям и т.п.

В описании и заявлении одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения будет применяться следующая терминология в соответствии с определениями, описанными ниже.

Применяемые в данном документе "PEG", "полиэтиленгликоль" и "поли(этиленгликоль)" являются взаимозаменяемыми и охватывают любой непептидный водорастворимый поли(этиленоксид). Как правило, PEG для применения в соответствии с настоящим изобретением включают следующую структуру  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где (n) составляет 2-4000. Применяемый в данном документе PEG также включает  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  и  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-$  в зависимости от того, были или не были замещены концевые кислороды, например, во время преобразования с помощью синтеза. Следует помнить, что во всем описании и формуле изобретения выражение "PEG" включает структуры с различными концевыми или "блокирующими конец" группами и т.д. Выражение "PEG" также означает полимер, который содержит большинство, а именно, более 50% повторяющихся субъединиц  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ . Что касается конкретных форм, PEG может принимать любое число из множества молекулярных масс, а также структур или геометрий, таких как "разветвленная", "линейная", "вильчатая", "многофункциональная" и т.п., что более подробно будет описано ниже.

Выражения "с заблокированным концом" и "блокированный на конце" взаимозаменяемо применяются в данном документе для обозначения границы или концевой точки полимера с концевым блокирующим компонентом. Обычно, хотя необязательно, концевой блокирующий компонент включает гидроксильную или  $\text{C}_{1-20}$  алкоксигруппу, более предпочтительно  $\text{C}_{1-10}$  алкоксигруппу и еще более предпочтительно  $\text{C}_{1-5}$  алкоксигруппу. Таким образом, примеры концевых блокирующих компонентов включают алкокси (например, метокси, этокси и бензилокси), а также арил, гетероарил, цикло, гетероцикло и т.п. Следует помнить, что концевой блокирующий компонент может включать один или несколько атомов концевого мономера в полимере [например, концевой блокирующий компонент "метокси" в  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  и  $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ]. К тому же предусматриваются насыщенные, ненасыщенные, замещенные и незамещенные формы каждого из вышеупомянутого. Более того, концевая блокирующая группа также может представлять собой силан. Концевая блокирующая группа также может преимущественно содержать обнаруживаемую метку. Если полимер имеет концевую блокирующую группу, содержащую обнаруживаемую метку, количество или локализацию полимера и/или компонента (например, активного средства), к которому присоединен полимер, можно определять с применением подходящего детектора. Такие метки включают, без ограничения, флуорофоры, хемилуминофоры, компоненты, применяемые в ферментном мечении, колориметрические вещества (например, красители), ионы металлов, радиоактивные компоненты и т.п. Подходящие детекторы включают фотометры, пленки, спектрометры и т.п. Концевая блокирующая группа также может преимущественно содержать фосфолипид. Если полимер имеет концевую блокирующую группу, содержащую фосфолипид, полимеру и полученному в результате конъюгату придаются особые свойства. Иллюстративные фосфолипиды включают, без ограничения, выбранные из класса фосфолипидов, называемых фосфатидилхолинами. Конкретные фосфолипиды включают, без ограничения, выбранные из группы, состоящей из дилауроилфосфатидилхолина, диолеилфосфатидилхолина, дипальмитоилфосфатидилхолина, дистероилфосфатидилхолина, бегеноилфосфатидилхолина, арахидоилфосфатидилхолина и лецитина. Концевая блокирующая группа также может включать нацеливающий компонент так, чтобы полимер - а также что-нибудь, например компонент IL-2, прикрепленный к нему - предпочтительно можно было локализовать в области, представляющей интерес.

"Невстречающийся в природе" в отношении полимера, описываемого в данном документе, означает полимер, который в целом не обнаруживается в природе. Невстречающийся в природе полимер может, однако, содержать один или несколько мономеров или сегментов мономеров, которые встречаются в природе, при условии, что полная полимерная структура не обнаруживается в природе.

Выражение "водорастворимый", например, в "водорастворимом полимере", полимер представляет собой любой полимер, который растворим в воде при комнатной температуре. Как правило, водорастворимый полимер будет пропускать по меньшей мере приблизительно 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% света, пропускаемого таким же раствором после фильтрации. По весу водорастворимый полимер предпочтительно будет растворим в воде по меньшей мере приблизительно на 35 вес.%, более предпочтительно растворим в воде по меньшей мере приблизительно на 50 вес.%, еще более предпочтительно растворим в воде приблизительно на 70 вес.% и еще более предпочтительно растворим в воде приблизительно на 85 вес.%. Наиболее предпочтительно, однако, чтобы водорастворимый полимер являлся растворимым в воде приблизительно на 95 вес.% или полностью растворимым в воде.

Молекулярная масса в контексте водорастворимого полимера, такого как PEG, может выражаться либо как среднечисловая молекулярная масса, либо как средневесовая молекулярная масса. Если не указывается иное, все ссылки на молекулярную массу в данном документе относятся к средневесовой молекулярной массе. Оба определения молекулярной массы, среднечисловой и средневесовой, могут изменяться с применением гельпроникающей хроматографии или других методик жидкостной хроматографии. Также можно применять другие способы измерения значений молекулярной массы, такие как применение анализа концевых групп или измерение коллигативных свойств (например, понижение температуры замерзания, повышение температуры кипения или осмотическое давление) для определения среднечисловой молекулярной массы или применение методик рассеивания света, ультрацентрифугирования или вискозиметрии для определения средневесовой молекулярной массы. Полимеры настоящего изобретения, как правило, полидисперсны (т.е. среднечисловая молекулярная масса и средневесовая молекулярная масса полимеров не равны), обладают низкими значениями полидисперсности предпочтительно меньше приблизительно 1,2, более предпочтительно меньше приблизительно 1,15, еще более предпочтительно меньше приблизительно 1,10, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 1,05 и наиболее предпочтительно меньше приблизительно 1,03.

Выражения "активный," "реакционноспособный" или "активированный" при применении совместно с определенной функциональной группой относятся к реакционноспособной функциональной группе, которая легко реагирует с электрофилом или нуклеофилом на другой молекуле. Это отличает их от групп, которым требуются сильные катализаторы или весьма нецелесообразные условия реакции, чтобы вступить в реакцию (т.е. "неракционноспособная" или "инертная" группа).

Применяемое в данном документе выражение "функциональная группа" или ее любой синоним подразумевает охватывание ее защищенных форм, а также незащищенных форм.

Выражения "спейсерный компонент", "связь" и "линкер" применяются в данном документе для обозначения связи или атома, или объединения атомов, необязательно применяемых для связывания взаимодействующих компонентов, таких как конец полимерного сегмента и компонент IL-2 или электрофил или нуклеофил компонента IL-2. Спейсерный компонент может быть гидролитически устойчивым или может включать физиологически гидролизующую или ферментативно разрушаемую связь. Кроме тех случаев, когда контекст явно предписывает иное, спейсерный компонент необязательно находится между любыми двумя элементами соединения (например, предусматриваемые конъюгаты, содержащие остаток компонента IL-2 и водорастворимый полимер, могут скрепляться напрямую или опосредованно через спейсерный компонент).

"Алкил" относится к углеводородной цепи, длина которой, как правило, находится в диапазоне от приблизительно 1 до 15 атомов. Такие углеводородные цепи предпочтительно, но не обязательно, насыщены и могут представлять собой разветвленную или прямую цепь, хотя, как правило, прямая цепь является предпочтительной. Иллюстративные алкильные группы включают метил, этил, пропил, бутил, пентил, 1-метилбутил, 1-этилпропил, 3-метилпентил и т.п. Применяемый в данном документе "алкил" включает циклоалкил, а также циклоалкилен-содержащий алкил.

"Низший алкил" относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода и представляющей собой прямую цепь или разветвленную, например, метил, этил, н-бутил, изо-бутил и трет-бутил.

"Циклоалкил" относится к насыщенной или ненасыщенной циклической углеводородной цепи, включая соединенные мостиковой связью, конденсированные или спироциклические соединения, предпочтительно состоящие из от 3 до приблизительно 12 атомов углерода, более предпочтительно от 3 до приблизительно 8 атомов углерода. "Циклоалкилен" относится к циклоалкильной группе, которая вставлена в алкильную цепь посредством связывания цепи в любых двух атомах углерода в циклическую кольцевую систему.

"Алкокси" относится к -OR группе, где R представляет собой алкил или замещенный алкил, предпочтительно C<sub>1-6</sub> алкил (например, метокси, этокси, пропилокси и т.д.).

Выражение "замещенный", например в "замещенном алкиле", относится к компоненту (например, алкильной группе), замещенному одним или несколькими неинтерферирующими заместителями, такими как, без ограничения: алкил, C<sub>3-8</sub> циклоалкил, например циклопропил, циклобутил и т.п.; галоген, например фтор, хлор, бром и йод; циано; алкокси, низший фенил; замещенный фенил и т.п. "Замещенный арил" представляет собой арил с одним или несколькими неинтерферирующими группами в качестве заместителя. Что касается замещений на фенильном кольце, заместители могут находиться в любом положении (т.е. орто, мета или пара).

"Неинтерферирующие заместители" представляют собой группы, которые, если присутствуют в молекуле, являются, как правило, неракционноспособными в отношении других функциональных групп, содержащихся в пределах молекулы.

"Арил" означает одно или несколько ароматических колец, каждое из 5 или 6 атомов углерода в ядре. Арил включает несколько арильных колец, которые могут быть конденсированными, как в нафтиле, или не конденсированными, как в бифениле. Арильные кольца также могут быть конденсированными или не конденсированными с одним или несколькими циклическими углеводородными, гетероарильными или гетероциклическими кольцами. Применяемый в данном документе "арил" включает гетероарил.

"Гетероарил" представляет собой арильную группу, содержащую от одного до четырех гетероатомов, предпочтительно серу, кислород или азот или их комбинацию. Гетероарильные кольца также могут быть конденсированными с одним или несколькими циклическими углеводородными, гетероциклическими, арильными или гетероарильными кольцами.

"Гетероцикл" или "гетероциклический" означает одно или несколько колец из 5-12 атомов, предпочтительно 5-7 атомов, с ненасыщенными связями или ароматическими свойствами или без них, и по меньшей мере с одним атомом кольца, не являющимся углеродом. Предпочтительные гетероатомы включают серу, кислород и азот.

"Замещенный гетероарил" представляет собой гетероарил с одной или несколькими неинтерферирующими группами в качестве заместителей.

"Замещенный гетероцикл" представляет собой гетероцикл с одной или несколькими боковыми цепями, образованными из неинтерферирующих заместителей.

Применяемый в данном документе "органический радикал" должен включать алкил, замещенный алкил, арил и замещенный арил.

"Электрофил" и "электрофильная группа" относится к иону или атому, или объединению атомов, которые могут быть ионными с электрофильным центром, т.е. центром, который является электроноакцепторным, способному реагировать с нуклеофилом.

"Нуклеофил" и "нуклеофильная группа" относится к иону или атому, или объединению атомов, которые могут быть ионными с нуклеофильным центром, т.е. центром, который стремится к электрофильному центру или электрофилу.

"Физиологически расщепляемая", или "гидролизуемая", или "разрушаемая" связь представляет собой связь, которая реагирует с водой (т.е. гидролизует) при физиологических условиях. Свойство связи гидролизироваться в воде будет зависеть не только от общего типа связи, соединяющей два центральных атома, но также от заместителей, прикрепленных к этим центральным атомам. Соответствующие гидролитически неустойчивые или слабые связи включают, но без ограничений, сложный эфир карбоновой кислоты, сложный эфир фосфорной кислоты, ангидриды, ацетали, кетали, ацилоксиалкиловые эфиры, имины, сложные ортоэфиры, пептиды и олигонуклеотиды.

"Ферментативно разрушаемая связь" означает связь, которая подвергается разрушению под влиянием одного или нескольких ферментов.

"Гидролитически устойчивый" мостик или связь относится к химической связи, как правило, ковалентной связи, которая практически устойчива в воде, а именно, не подвергается гидролизу при физиологических условиях до какой-либо заметной степени в течение длительного периода времени. Примеры гидролитически устойчивых мостиков включают, но без ограничений, следующие: углерод-углеродные связи (например, в алифатических цепях), простые эфиры, амиды, уретаны и т.п. В целом гидролитически устойчивый мостик представляет собой такой, который проявляет степень гидролиза меньше приблизительно 1-2% в день при физиологических условиях. Степени гидролиза типовых химических связей можно найти в большинстве справочников по химии.

"Фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель" относится к наполнителю, который обязательно может включаться в композиции настоящего изобретения и который не вызывает значительных неблагоприятных токсических эффектов у пациента. "Фармакологически эффективное количество", "физиологически эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения количества конъюгата полимер-компонент (IL-2), которое необходимо для обеспечения требуемого уровня конъюгата (или соответствующего неконъюгированного компонента IL-2) в кровотоке или в целевой ткани. Точное количество будет зависеть от многочисленных факторов, например определенного компонента IL-2, ингредиентов и физических характеристик терапевтической композиции, предусматриваемой группы пациентов, соотношений относительно отдельных пациентов и т.п., и может легко определяться специалистом в данной области, исходя из информации, обеспеченной в данном документе.

"Многофункциональный" означает, что полимер имеет три или более функциональных групп, содержащихся в нем, где функциональные группы могут быть одинаковыми или различными. Многофункциональные полимерные реагенты настоящего изобретения, как правило, будут содержать приблизительно 3-100 функциональных групп, или 3-50 функциональных групп, или 3-25 функциональных групп, или 3-15 функциональных групп, или от 3 до 10 функциональных групп, или будут содержать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 функциональных групп в пределах главной цепи полимера.

Применяемое в данном документе выражение "компонент IL-2" относится к компоненту с активностью человеческого IL-2. Компонент IL-2 также будет иметь по меньшей мере одну электрофильную группу или нуклеофильную группу, подходящие для реакции с полимерным реагентом. К тому же выражение "компонент IL-2" охватывает как компонент IL-2 перед конъюгацией, так и остаток компонента IL-2 после конъюгации. Как будет объясняться более подробно ниже, рядовой специалист в данной области может определить, обладает ли какой-нибудь данный компонент активностью IL-2. Белок, содержащий аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 1-4, представляет собой компонент IL-2, а также любой белок или полипептид по существу гомологичный ему. Применяе-

мое в данном документе выражение "компонент IL-2" включает такие белки, модифицированные преднамеренно, как например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или случайно посредством мутаций. Эти выражения также включают аналоги с 1-6 дополнительными сайтами гликозилирования, аналоги по меньшей мере с одной дополнительной аминокислотой на карбокси-конце белка, где дополнительная аминокислота(ы) включает по меньшей мере один сайт гликозилирования, и аналоги с аминокислотной последовательностью, которая включает по меньшей мере один сайт гликозилирования. Выражение включает как естественные, так и рекомбинантно полученные компоненты.

Выражение "по существу гомологичный" означает, что определенная рассматриваемая последовательность, например мутантная последовательность, отличается от эталонной последовательности одним или несколькими замещениями, делециями или добавлениями, совокупный эффект которых не приводит в результате к неблагоприятному функциональному расхождению между эталонной и рассматриваемой последовательностями. Для целей настоящего изобретения последовательности с гомологией больше 80 % (более предпочтительно больше 85 %, еще более предпочтительно больше 90 %, наиболее предпочтительными являются таковые с гомологией более 95 %), эквивалентной биологической активностью (хотя не обязательно эквивалентной силы биологической активностью) и эквивалентными характеристиками экспрессии считают по существу гомологичными. Для целей определения гомологии усечением зрелой последовательности следует пренебрегать. Иллюстративные компоненты IL-2 для применения в данном документе включают последовательности, которые по существу гомологичны SEQ ID NO: 2.

Выражение "фрагмент" означает любой белок или полипептид с аминокислотной последовательностью части или фрагмента компонента IL-2, и который обладает биологической активностью IL-2. Фрагменты включают белки или полипептиды, образуемые при протеолитическом разрушении компонента IL-2, а также белки или полипептиды, образуемые с помощью химического синтеза посредством способов, общепринятых в данной области техники.

Выражение "пациент" относится к живому организму, страдающему или подверженному состоянию, которое можно предупреждать или лечить с помощью введения активного средства (например, конъюгата), и включает как людей, так и животных.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описываемое далее обстоятельство может встречаться или не встречаться, так что описание включает случаи, в которых обстоятельство встречается, и случаи, в которых оно не встречается.

"По существу" означает едва ли не абсолютно или полностью, например, удовлетворяет одному или нескольким из следующего: более 50, 51% или более, 75% или более, 80% или более, 90% или более и 95% или более из условий.

Применяемая в данном документе "идентичность последовательности" определяется сравнением последовательности эталонной последовательности ДНК с такой частью другой последовательности ДНК, выравниваемой таким образом, чтобы максимально увеличить перекрытие между двумя последовательностями, при этом снижая до минимума гэпы последовательностей, где любые выступающие последовательности между двумя последовательностями игнорируются. В отношении любой идентичности последовательности, описанной в данном документе, предпочтительна по меньшей мере 80%, более предпочтительна 85%, все более предпочтительна 90%, еще все более предпочтительна 95% идентичность последовательности с наиболее предпочтительными 96, 97, 98 и 99% идентичностями последовательности.

Аминокислотные остатки в пептидах сокращаются следующим образом: фенилаланин обозначается Phe или F; лейцин обозначается Leu или L; изолейцин обозначается Ile или I; метионин обозначается Met или M; валин обозначается Val или V; серин обозначается Ser или S; пролин обозначается Pro или P; треонин обозначается Thr или T; аланин обозначается Ala или A; тирозин обозначается Tyr или Y; гистидин обозначается His или H; глутамин обозначается Gln или Q; аспарагин обозначается Asn или N; лизин обозначается Lys или K; аспарагиновая кислота обозначается Asp или D; глутаминовая кислота обозначается Glu или E; цистеин обозначается Cys или C; триптофан обозначается Trp или W; аргинин обозначается Arg или R, и глицин обозначается Gly или G.

Возвращаясь к одному или нескольким вариантам осуществления настоящего изобретения, предусматривается конъюгат, причем конъюгат содержит остаток компонента IL-2, ковалентно прикрепленного (или напрямую, или через спейсерный компонент) к водорастворимому полимеру. Конъюгаты настоящего изобретения будут иметь один или несколько из следующих признаков.

Компонент IL-2.

Как отмечалось ранее, конъюгат в общем содержит остаток компонента IL-2, ковалентно прикрепленного, или напрямую, или через спейсерный компонент, к водорастворимому полимеру. Применяемое в данном документе выражение "компонент IL-2" должно относиться к компоненту IL-2 перед конъюгацией, а также к компоненту IL-2 после прикрепления к непептидному водорастворимому полимеру. Будет понятно, однако, что если исходный компонент IL-2 присоединяется к непептидному водорастворимому полимеру, компонент IL-2 немного меняется из-за присутствия одной или нескольких ковалентных связей, обусловленных связыванием с полимером(ами). Зачастую, эту слегка измененную форму компонента IL-2, прикрепленную к другой молекуле, относят к "остатку" компонента IL-2.

Компонент IL-2 можно получать нерекombинантными способами и рекомбинантными способами, и настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении. К тому же компонент IL-2 можно получать из человеческих источников, животных источников и растительных источников.

Компонент IL-2 можно получать нерекombинантно. Например, возможно выделять IL-2 из биологических систем и, наоборот, получать IL-2 из культуральной среды. См., например, процедуры, описанные в патенте США № 4401756 и у Pauly et al. (1984)7. *Immunol. Methods* 75(1):73-84.

Компонент IL-2 можно получать рекомбинантными способами. См., например, патент США № 5614185, раскрытие и экспериментальную часть, предоставленные в данном документе.

Любой компонент IL-2, полученный с помощью нерекombинантных или рекомбинантных подходов, может применяться в качестве компонента IL-2 при получении конъюгатов, описанных в документе.

Компонент IL-2 может экспрессироваться в бактериальной системе экспрессии [например, *E.coli*, см., например, Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. BioIL-2m*. 21 (3):295-311], системе экспрессии млекопитающих [см., например, Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304], дрожжевой [например, *Pichia pastoris*, см., например, Morel et al. (1991) *Biochem. J.* 328(1): 121-129] и растительной [см., например, Mog et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] системах экспрессии. Экспрессия может происходить путем экзогенной экспрессии (когда клетка-хозяин по природе содержит требуемый генетический код) или путем эндогенной экспрессии.

Хотя основанные на рекомбинантах способы получения белков могут отличаться, рекомбинантные способы, как правило, включают конструирование нуклеиновой кислоты, кодирующей требуемый полипептид или фрагмент, клонирование нуклеиновой кислоты в вектор экспрессии, трансформацию клетки-хозяина (например, растительной, бактериальной, дрожжевой, трансгенной животной клетки или клетки млекопитающего, такой как клетка яичников китайского хомячка или клетка почки детеныша хомячка) и экспрессию нуклеиновой кислоты с получением требуемого полипептида или фрагмента. Способы получения и экспрессии рекомбинантных полипептидов *in vitro* и в прокариотических и в эукариотических клетках-хозяевах известны специалистам в данной области.

Чтобы облегчить идентификацию и очистку рекомбинантного полипептида, в рамку с кодирующей последовательностью можно вставлять или добавлять последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие эпитопную метку, или другую последовательность для аффинного связывания, что, таким образом, дает белок слияния, содержащий требуемый полипептид и полипептид, пригодный для связывания. Белки слияния можно идентифицировать и очищать с помощью, прежде всего, прогона смеси, содержащей белок слияния, через колонку для аффинной хроматографии, несущую компоненты связывания (например, антитела), направленные на эпитопную метку или другую последовательность связывания в белках слияния, таким образом, связывая белок слияния в колонке. После этого белок слияния можно выделить посредством промывки колонки подходящим раствором (например, кислотой) для высвобождения связанного белка слияния. Рекомбинантный полипептид также можно очищать путем лизирования клеток-хозяев, отделения полипептида, например, с помощью ионообменной хроматографии, подходов с аффинным связыванием, подходов с гидрофобным взаимодействием и, после этого, идентифицирования с помощью MALDI или вестерн-блоттинга и сбора полипептида. Эти и другие способы идентификации и очистки рекомбинантных полипептидов известны специалистам в данной области. В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, однако, компонент IL-2 не находится в форме белка слияния.

В зависимости от системы, применяемой для экспрессии белков с активностью IL-2, компонент IL-2 может быть негликозилированным или гликозилированным, и может применяться тот и другой. Т.е. компонент IL-2 может быть негликозилированным или компонент IL-2 может быть гликозилированным. В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения компонент IL-2 является негликозилированным.

Компонент IL-2 преимущественно можно модифицировать с включением и/или замещением одного или нескольких аминокислотных остатков, таких как, например, лизин, цистеин и/или аргинин, для обеспечения свободного прикрепления полимера к атому в боковой цепи аминокислоты. Пример замещения компонента IL-2 описывается в патенте США № 5206344. К тому же компонент IL-2 можно модифицировать с включением не встречающегося в природе аминокислотного остатка. Методики добавления аминокислотных остатков и не встречающихся в природе аминокислотных остатков хорошо известны специалистам в данной области. Приводится ссылка на J. March, *Advanced Organic IL-2mistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4<sup>th</sup> Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

К тому же компонент IL-2 преимущественно можно модифицировать с включением прикрепления функциональной группы (иным образом, чем через добавление аминокислотного остатка, содержащего функциональную группу). Например, компонент IL-2 можно модифицировать с включением тиоловой группы. К тому же компонент IL-2 можно модифицировать с включением N-концевого  $\alpha$ -углерода. К тому же компонент IL-2 можно модифицировать с включением одного или нескольких углеводных компонентов. К тому же компонент IL-2 можно модифицировать с включением альдегидной группы. К тому же компонент IL-2 можно модифицировать с включением кетонной группы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы компонент IL-2 не модифицировался с



включением одной или нескольких тиоловых групп, N-концевого  $\alpha$ -углерода, углевода, альдегидной группы и кетонной группы.

Иллюстративные компоненты IL-2 описаны в литературе и, например, в патентах США № 5116943, 5153310, 5635597, 7101965 и 7567215 и публикациях заявок на патент США № 2010/0036097 и 2004/0175337. Предпочтительные компоненты IL-2 включают таковые с аминокислотной последовательностью, включающей последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, и последовательностей по существу гомологичных им. Предпочтительный компонент IL-2 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 3.

В некоторых случаях компонент IL-2 будет находиться в "мономерной" форме, где один продукт экспрессии соответствующего пептида организован в дискретную единицу. В других случаях компонент IL-2 будет находиться в форме "димера" (например, димера рекомбинантного IL-2), где две мономерные формы белка ассоциированы (например, с помощью дисульфидной связи) друг с другом. Например, в контексте димера рекомбинантного человеческого IL-2, димер может находиться в форме двух мономеров, ассоциированных друг с другом с помощью дисульфидной связи, образованной из остатка Cys125 каждого мономера.

К тому же в качестве компонента IL-2 могут применяться формы-предшественники IL-2. Иллюстративная форма-предшественник IL-2 имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

Усеченные виды, гибридные варианты и пептидные миметики любой из вышеуказанных последовательностей также могут служить в качестве компонента IL-2. Биологически активные фрагменты, варианты с делецией, варианты с замещением или варианты с добавлением любого из вышеуказанного, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторую степень активности IL-2, также могут служить в качестве компонента IL-2.

Для любого указанного пептида или белкового компонента можно определить, имеет ли данный компонент активность IL-2. Различные способы определения активности IL-2 *in vitro* описаны в уровне техники. Иллюстративный подход представляет собой анализ пролиферации клеток CTTL-2, описанный в экспериментальной части ниже. Иллюстративный подход описан у Moreau et al. (1995) *Mol. Immunol.* 32:1047-1056). Кратко, в анализе неспецифического связывания обеспечивают предварительное инкубирование предлагаемого компонента IL-2 в течение одного часа при 4°C в присутствии клеточной линии, несущей рецептор IL-2. После этого обеспечивают инкубирование <sup>125</sup>I-меченного IL-2 в системе в течение трех часов при 4°C. Данные выражают как % ингибиторной способности активности предлагаемого компонента IL-2 в сравнении с IL-2 дикого типа. Другие методики, известные в уровне техники, также можно применять для оценки функции IL-2, в том числе электрометрические, спектрофотометрические, хроматографические и радиометрические методики.

Водорастворимый полимер.

Как уже указано, каждый конъюгат содержит компонент IL-2, прикрепленный к водорастворимому полимеру. Что касается водорастворимого полимера, то водорастворимый полимер является непептидным, нетоксичным, не встречающимся в природе и биосовместимым. Что касается биосовместимости, вещество считается биосовместимым, если благоприятные эффекты, ассоциированные с применением вещества самого или с другим веществом (например, активным средством, таким как компонент IL-2), по отношению к живым тканям (например, введению пациенту) превосходят любые губительные эффекты, как оценивает клиницист, например терапевт. Что касается неиммуногенности, вещество считается неиммуногенным, если предусматриваемое применение вещества *in vivo* не приводит к нежелательному иммунному ответу (например, к образованию антител) или, если иммунный ответ происходит, то такой ответ не воспринимается как клинически значимый или важный, как оценивает клиницист. Особенно предпочтительно, чтобы непептидный водорастворимый полимер являлся биосовместимым и неиммуногенным.

Кроме того, полимер, как правило, отличается тем, что имеет от 2 до приблизительно 300 концевых элементов. Примеры таких полимеров включают, но без ограничений, 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( $\alpha$ -гидроксикислоту), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины ("POZ") (которые описаны в WO 2008/106186), поли(N-акрилоилморфолин) и комбинации любого из вышеуказанного.

Водорастворимый полимер не ограничивается определенной структурой и может быть линейным (например, с концевой блокирующей группой, например, алкокси-PEG или бифункциональным PEG), разветвленным или многоплечим (например, вильчатым PEG или PEG, прикрепленным к полиольному ядру), древовидного (или звездчатого) строения, каждый с одной или несколькими разрушаемыми связями или без них. Более того, внутренняя структура водорастворимого полимера может быть организована в любое количество различных повторяющихся паттернов и может быть выбрана из группы, состоящей из гомополимера, чередующегося сополимера, случайного сополимера, блок-сополимера, чередующегося триполимера, случайного триполимера и блок-триполимера.

Как правило, активированный PEG и другие активированные водорастворимые полимеры (т.е. полимерные реагенты) активируют с помощью подходящей активирующей группы, которая пригодна для связывания с требуемым сайтом на компоненте IL-2. Таким образом, полимерный реагент будет обладать реакционноспособной группой для реакции с компонентом IL-2. Типичные полимерные реагенты и способы конъюгирования этих полимеров с активным компонентом известны из уровня техники и дополнительно описаны у Zalipsky S. et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" в Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992) и у Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16:157-182. Иллюстративные активирующие группы, подходящие для связывания с компонентом IL-2, включают, наряду с прочими, гидроксил, малеимид, сложный эфир, ацеталь, кеталь, амин, карбоксил, альдегид, альдегидгидрат, кетон, винилкетон, тион, тиол, винилсульфон, гидразин.

Предпочтительно, полимерный реагент, применяемый для получения конъюгатов, описанных в данном документе, получают без применения фосгена. Такой подход отличается, например, от раскрытия, изложенного в патенте США № 4902502, в котором, в частности, описывается образование хлорформиата и его последующее применение для образования активного сложного эфира PEG, который затем вводят в реакцию с IL-2. Применение фосгена приводит к образованию хлороводорода, который может привести к расщеплению цепи в полимере, таким образом, повышая количество примесей, которые нельзя удалить с применением традиционных методик. Таким образом, не желая быть связанным теорией, конъюгаты компонента IL-2, получаемые из полимерных реагентов, образованных без применения фосгена, предусматривают композиции более высокого качества, в которых по существу отсутствуют продукты распада полимерной цепи. Также, в одном или нескольких вариантах осуществления спейсерный компонент между водорастворимым полимером и компонентом IL-2 представляет собой спейсерный компонент, не содержащий карбамат.

Как правило, средневесовая молекулярная масса водорастворимого полимера в конъюгате составляет от приблизительно 100 Да до приблизительно 150000 Да. Иллюстративные диапазоны, однако, включают средневесовые молекулярные массы в диапазоне от больше 5000 Да до приблизительно 100000 Да, в диапазоне от приблизительно 6000 Да до приблизительно 90000 Да, в диапазоне от приблизительно 10000 Да до приблизительно 85000 Да, в диапазоне от больше 10000 Да до приблизительно 85000 Да, в диапазоне от приблизительно 20000 Да до приблизительно 85000 Да, в диапазоне от приблизительно 53000 Да до приблизительно 85000 Да, в диапазоне от приблизительно 25000 Да до приблизительно 120000 Да, в диапазоне от приблизительно 29000 Да до приблизительно 120000 Да, в диапазоне от приблизительно 35000 Да до приблизительно 120000 Да и в диапазоне от приблизительно 40000 Да до приблизительно 120000 Да. Для любого указанного водорастворимого полимера предпочтительны PEG с молекулярной массой в одном или нескольких из этих диапазонов.

Иллюстративные средневесовые молекулярные массы для водорастворимого полимера включают приблизительно 100 Да, приблизительно 200 Да, приблизительно 300 Да, приблизительно 400 Да, приблизительно 500 Да, приблизительно 600 Да, приблизительно 700 Да, приблизительно 750 Да, приблизительно 800 Да, приблизительно 900 Да, приблизительно 1000 Да, приблизительно 1500 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 2200 Да, приблизительно 2500 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 4400 Да, приблизительно 4500 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 5500 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 7500 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да, приблизительно 10000 Да, приблизительно 11000 Да, приблизительно 12000 Да, приблизительно 13000 Да, приблизительно 14000 Да, приблизительно 15000 Да, приблизительно 20000 Да, приблизительно 22500 Да, приблизительно 25000 Да, приблизительно 30000 Да, приблизительно 35000 Да, приблизительно 40000 Да, приблизительно 45000 Да, приблизительно 50000 Да, приблизительно 55000 Да, приблизительно 60000 Да, приблизительно 65000 Да, приблизительно 70000 Да и приблизительно 75000 Да. Также можно применять разветвленные виды водорастворимого полимера (например, разветвленный водорастворимый полимер 40000 Да состоит из двух полимеров 20000 Да) с любой общей молекулярной массой из вышеуказанных. В одном или нескольких вариантах осуществления конъюгат не будет иметь каких-либо прикрепленных компонентов PEG, либо напрямую, либо опосредованно, в случае PEG со средневесовой молекулярной массой меньше приблизительно 6000 Да.

При применении в качестве полимера PEG, как правило, будут содержать ряд мономеров  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$  [или мономеров  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ , в зависимости от того, как определяют PEG]. Как применяется на протяжении всего описания, число повторяющихся элементарных звеньев указывается с помощью нижнего индекса "n" в " $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ". Таким образом, значение (n), как правило, находится в пределах одного или нескольких 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 указанного полимера, у которого

молекулярная масса известна, можно определить количество повторяющихся звеньев (т.е. "n") с помощью деления общей средневесовой молекулярной массы полимера на молекулярную массу повторяющегося мономера.

Одним особенно предпочтительным полимером для применения в настоящем изобретении является полимер с заблокированным концом, т.е. полимер по меньшей мере с одним концевым элементом, заблокированным относительно инертной группой, такой как низшая C<sub>1-6</sub> алкоксигруппа, хотя гидроксильная группа также может применяться. Если полимер представляет собой PEG, например, предпочтительно применять метокси-PEG (обычно называемый как mPEG), который представляет собой линейную форму PEG, где один концевой элемент полимера представляет собой метоксильную группу (-OCH<sub>3</sub>), в то время как другой концевой элемент представляет собой гидроксил или другую функциональную группу, которую необязательно можно химически модифицировать.

В одной форме, применимой в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, свободный или несвязанный PEG представляет собой линейный полимер, заканчивающийся на каждом конце гидроксильными группами:



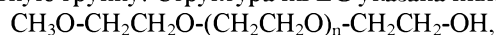
где (n), как правило, находится в диапазоне от нуля до приблизительно 4000.

Вышеуказанный полимер, α-, ω-дигидроксиполи(этиленгликоль), можно представить в краткой форме как HO-PEG-OH, где понимается, что символ -PEG-может представлять следующую структурную единицу:



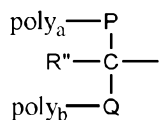
где (n) является таким, как определено выше.

Другим типом PEG, применимым в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, является метокси-PEG-OH, или коротко mPEG, в котором один концевой элемент представляет собой относительно инертную метоксильную группу, в то время как другой концевой элемент представляет собой гидроксильную группу. Структура mPEG указана ниже:



где (n) является таким, как определено выше.

Многоплечие или разветвленные молекулы PEG, такие как описываемые в патенте США № 5932462, также можно применять в качестве полимера PEG. Например, PEG может иметь структуру:

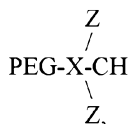


где poly<sub>a</sub> и poly<sub>b</sub> представляют собой главные цепи PEG (либо одинаковые, либо различные), такие как метоксиполи(этиленгликоль);

R'' представляет собой нереакционноспособный компонент, такой как H, метил или главная цепь PEG; и

P и Q представляют собой нереакционноспособные связи. В предпочтительном варианте осуществления разветвленный PEG полимер представляет собой двузамещенный метоксиполи(этиленгликолем) лизин. В зависимости от применяемого конкретного компонента IL-2 реакционноспособная сложноэфирная функциональная группа двузамещенного лизина может дополнительно модифицироваться с образованием функциональной группы, подходящей для реакции с целевой группой в пределах компонента IL-2.

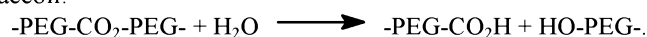
К тому же PEG может включать вильчатый PEG. Пример вильчатого PEG представлен следующей структурой:



где X представляет собой спейсерный компонент из одного или нескольких атомов, и каждый Z представляет собой активированную концевую группу, связанную с CH посредством цепочки из атомов определенной длины. В публикации международной заявки на патент WO 99/45964 раскрываются различные вильчатые структуры PEG, которые можно применять в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения. Цепь из атомов, связывающая функциональные группы Z с разветвляющим атомом углерода, служит в качестве привязывающей группы и может включать, например, алкильные цепи, эфирные цепи, сложноэфирные цепи, амидные цепи и их комбинации.

Полимер PEG может включать боковую цепь молекулы PEG с реакционноспособными группами, такими как карбоксильная, ковалентно прикрепленными скорее по длине PEG, а не на конце цепи PEG. Реакционноспособные группы боковых цепей могут прикрепляться к PEG напрямую или через спейсерный компонент, такой как алкиленовая группа.

Кроме вышеописанных форм PEG, полимер также можно получать с одной или несколькими слабыми или разрушаемыми связями в полимере, включая любой из вышеописанных полимеров. Например, PEG можно получать со сложноэфирными связями в полимере, которые подвергаются гидролизу. Как показано ниже, этот гидролиз приводит в результате к расщеплению полимера на фрагменты с более низкой молекулярной массой:



Другие гидролитически разрушаемые связи, применимые в качестве разрушаемой связи в пределах главной цепи полимера и/или в качестве разрушаемой связи с компонентом IL-2, включают: карбонатные связи; иминовые связи, образующиеся в результате, например, реакции амина и альдегида (см., например, Ouchi et al. (1997) *Polymer Preprints* 38(1):582-3); связи на основе сложного эфира фосфорной кислоты, образованные, например, с помощью реакции спирта с фосфатной группой; гидразоновые связи, которые, как правило, образуются с помощью реакции гидразида и альдегида; ацетальные связи, которые, как правило, образуются с помощью реакции между альдегидом и спиртом; ортоэфирные связи, которые, например, образуются с помощью реакции между формиатом и спиртом; амидные связи, образованные с помощью аминоксильных групп, например, на конце полимера, такого как PEG, и карбоксильной группы другой цепи PEG; уретановые связи, образованные в результате реакции, например, PEG с концевой изоцианатной группой и PEG-спиртом; пептидные связи, образованные с помощью аминоксильных групп, например, на конце полимера, такого как PEG, и карбоксильной группы пептида, и олигонуклеотидные связи, образованные с помощью, например, фосфорамидитной группы, например, на конце полимера, и 5'-гидроксильной группы олигонуклеотида.

Такие необязательные признаки конъюгата, т.е. введение одной или нескольких разрушаемых связей в полимерную цепь или в компонент IL-2, можно предусматривать для дополнительного контроля за конечными требуемыми фармакологическими свойствами конъюгата при введении. Например, можно вводить крупный и относительно инертный конъюгат (т.е. с одной или несколькими высокомолекулярными цепями PEG, прикрепленными к нему, например, одной или несколькими цепями PEG с молекулярной массой больше приблизительно 10000, где конъюгат по сути не обладает биоактивностью), который разрывается с образованием биоактивного конъюгата, обладающего частью исходной цепи PEG. Следовательно, свойства конъюгата можно более эффективно адаптировать для оптимизации биоактивности конъюгата с течением времени.

Водорастворимый полимер, ассоциированный с конъюгатом, также может быть "поддающимся разрыву". Т.е. водорастворимый полимер разрывается (или посредством гидролиза, ферментативных процессов, каталитических процессов, или иным способом), таким образом, что приводит в результате к неконъюгированному компоненту IL-2. В некоторых случаях поддающиеся разрыву полимеры отделяются от компонента IL-2 *in vivo*, не оставляя какого-либо фрагмента водорастворимого полимера. В других случаях поддающиеся разрыву полимеры отделяются от компонента IL-2 *in vivo*, оставляя относительно небольшой фрагмент (например, сукцинатную метку) из водорастворимого полимера. Иллюстративный расщепляемый полимер включает таковой, присоединяемый к компоненту IL-2 посредством карбонатной связи.

Специалисты в данной области будут понимать, что вышеизложенное обсуждение, касающееся не пептидного и водорастворимого полимера, далеко не исчерпывающее и имеет лишь иллюстративный характер, и что предусматриваются все полимерные материалы, обладающие качествами, описанными выше. Применяемое в данном документе выражение "полимерный реагент" в целом относится ко всей молекуле, которая может содержать сегмент водорастворимого полимера и функциональную группу.

Как описано выше, конъюгат настоящего изобретения содержит водорастворимый полимер, ковалентно прикрепленный к компоненту IL-2. Как правило, для любого указанного конъюгата будет существовать от одного до трех водорастворимых полимеров, ковалентно прикрепленных к одному или нескольким компонентам с активностью IL-2. В некоторых случаях, однако, конъюгат может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более водорастворимых полимеров, самостоятельно прикрепленных к компоненту IL-2. Любой указанный водорастворимый полимер может ковалентно присоединяться или к аминокислоте компонента IL-2, или, если компонент IL-2 представляет собой (например) гликопротеин, к углеводу компонента IL-2. Прикрепление к углеводу можно выполнять, например, с применением метаболической функционализации с использованием химии сиаловой кислоты-азида [Luchansky et al. (2004) *Biochemistry* 43(38): 12358-12366] или других подходящих подходов, таких как применение глицидола для облегчения введения альдегидных групп [Heldt et al. (2007) *European Journal of Organic Chemistry* 32:5429-5433].

Определенная связь в пределах компонента с активностью IL-2 и полимера зависит от ряда факторов. Такие факторы включают, например, химию определенной используемой связи, определенный компонент IL-2, доступные функциональные группы в пределах компонента IL-2 (или для прикрепления к полимеру, или превращения в подходящий сайт прикрепления), присутствие дополнительных реакционноспособных функциональных групп в пределах компонента IL-2 и т.п.

Конъюгаты настоящего изобретения могут представлять собой, хотя не обязательно, пролекарства, а это означает, что связь между полимером и компонентом IL-2 поддается разрыву, что обеспечивает

возможность высвобождения исходного компонента. Иллюстративные поддающиеся разрыву связи включают сложный эфир карбоновой кислоты, сложный эфир фосфорной кислоты, тиоловый сложный эфир, ангидриды, ацетали, кетали, ацилоксиалкиловые сложные эфиры, имины, ортоэфиры, пептиды и олигонуклеотиды. Такие связи можно легко получать с помощью подходящей модификации или компонента IL-2 (например, карбоксильной группы С-конца белка или гидроксильной группы боковой цепи аминокислоты, такой как серин или треонин, содержащейся в белке, или подобной функциональности в углеводе), и/или полимерного реагента с применением способов связывания, широко используемых в области техники. Наиболее предпочтительными, однако, являются поддающиеся разрыву связи, которые легко образуются с помощью реакции активированного подходящим образом полимера с немодифицированной функциональной группой, содержащейся в пределах компонента с активностью IL-2.

Кроме того, в качестве связи для соединения компонента IL-2 также может использоваться гидролитически устойчивая связь, такая как амидная, уретановая (также известная как карбаматная), аминная, через простой тиоэфир (также известная как сульфидная) или мочевиная (также известная как карбамидная). К тому же предпочтительной гидролитически устойчивой связью является амид. В одном подходе водорастворимый полимер, несущий активированный сложный эфир, можно вводить в реакцию с аминок группой на компоненте IL-2, что, таким образом, приводит к амидной связи.

Конъюгаты (в отличие от неконъюгированного компонента IL-2) могут обладать или могут не обладать измеримой степенью активности IL-2. Другими словами, конъюгат полимер-компонент IL-2 в соответствии с настоящим изобретением будет в любом случае обладать биоактивностью в пределах от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% биоактивности немодифицированного исходного компонента IL-2. В некоторых случаях конъюгаты полимер-компонент IL-2 могут иметь биоактивность более 100% биоактивности немодифицированного исходного компонента IL-2. Предпочтительно, конъюгаты, обладающие небольшой или с отсутствием активности IL-2, содержат гидролизующую связь, соединяющую полимер с компонентом, так что независимо от отсутствия (или относительного отсутствия) активности у конъюгата активная исходная молекула (или ее производное) высвобождается при индуцированном водой расщеплении гидролизующей связи. Такую активность можно определить с применением подходящей *in-vivo* или *in-vitro* модели в зависимости от известной активности определенного используемого компонента с активностью IL-2.

Для конъюгатов, обладающих гидролитически устойчивой связью, которая связывает компонент с активностью IL-2 с полимером, конъюгат, как правило, будет обладать измеримой степенью биоактивности. Например, такие конъюгаты, как правило, отличаются тем, что имеют биоактивность, отвечающую одной или нескольким из следующих процентных долей относительно биоактивности неконъюгированного компонента IL-2: по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 100% и более 105% (при измерении на подходящей модели, такой как те, что хорошо известны в области техники). Предпочтительно, конъюгаты с гидролитически устойчивой связью (например, амидной связью) будут обладать по меньшей мере некоторой степенью биоактивности немодифицированного исходного компонента с активностью IL-2.

Теперь будут описаны иллюстративные конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением. Как правило, ожидается, что такой компонент IL-2 имеет (по меньшей мере, частично) аминокислотную последовательность, подобную последовательности, обеспечиваемой по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 1-4. Таким образом, несмотря на то что будет делаться ссылка на определенные положения или атомы в пределах SEQ ID NO: 1-4, такая ссылка приводится только для удобства и специалист в данной области сможет легко определить соответствующее положение или атом в других компонентах с активностью IL-2. В частности, описание, предусматриваемое в данном документе, для нативного человеческого IL-2 часто применимо к фрагментам, вариантам с делецией, вариантам с замещением или вариантам с добавлением любого из вышеуказанного.

Аминогруппы на компонентах IL-2 предусматривают точку прикрепления компонента IL-2 к водорастворимому полимеру. При применении аминокислотной последовательности, обеспеченной в SEQ ID NO: 1-4, очевидно, что в каждой имеется несколько лизиновых остатков с  $\epsilon$ -аминокислотой, которая может быть доступна для конъюгации. Более того, N-концевая аминокислотная группа любого белка также может служить точкой прикрепления.

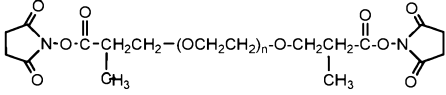
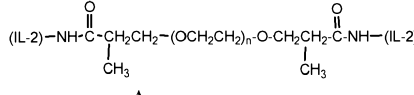
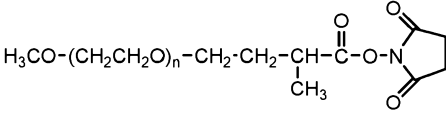
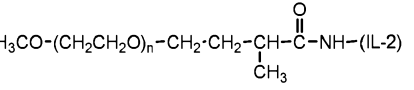
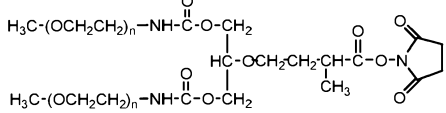
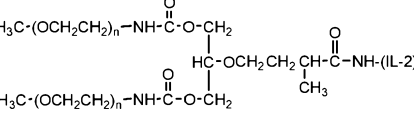
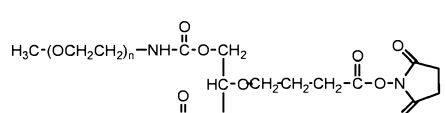
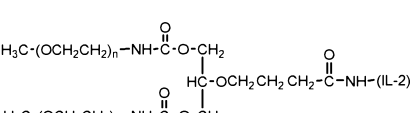
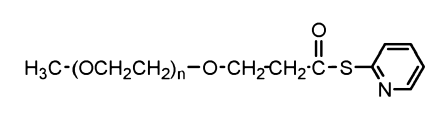
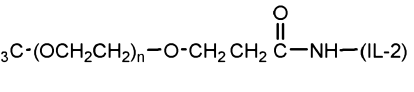
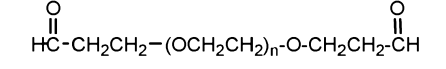
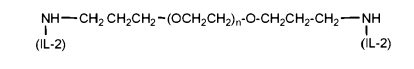
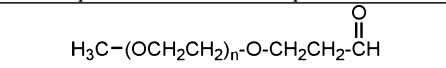
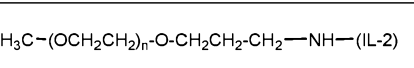
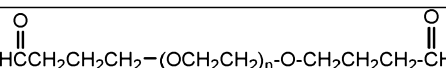
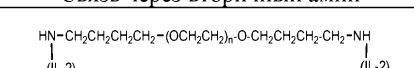
Имеется ряд примеров подходящих полимерных реагентов, применимых для образования ковалентных связей с доступными аминокислотными группами компонента IL-2. Конкретные примеры вместе с соответствующим конъюгатом представлены в табл. 1 ниже. В таблице переменная (n) представляет количество повторяющихся мономерных звеньев, и "-NH-(IL-2)" представляет остаток компонента IL-2 после конъюгации с полимерным реагентом. Хотя каждая полимерная часть [например,  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$  или  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ], представленная в табл. 1, оканчивается группой "CH<sub>3</sub>", она может быть замещена другими

группами (такими как Н и бензил).

Таблица 1. Полимерные реагенты, селективные в отношении амина, и образованный из них конъюгат с компонентом ИЛ-2

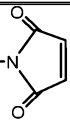
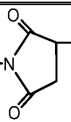
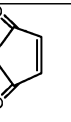
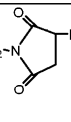
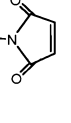
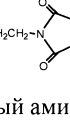
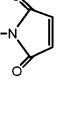
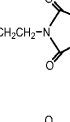


Полимерный реагент	Соответствующий конъюгат
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N} \\ \text{C} \\ \text{N} \end{array}$ <p>mPEG-оксикарбонилимидазольные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Карбаматная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ <p>mPEG-нитрофенильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Карбаматная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3$ <p>mPEG-трихлорфенил-карбонатные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Карбаматная связь</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}-\text{N} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array}$ <p>Гомобифункциональные PEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$(\text{IL-2})-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидные связи</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HN}-\text{NH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S} \end{array} (\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>Гетеробифункциональные PEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HN}-\text{NH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S} \end{array} (\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{C} \\ \text{N} \\ \text{C} \end{array}$ <p>mPEG-бензотриазол-карбонатные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Карбаматная связь</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Карбаматная связь</p>

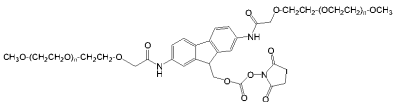
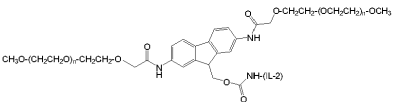
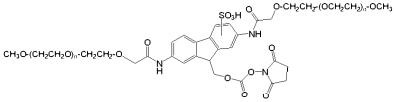
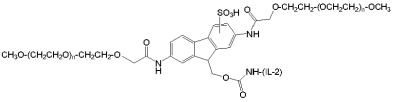
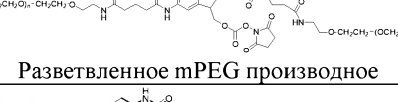
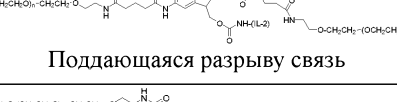
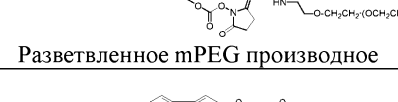
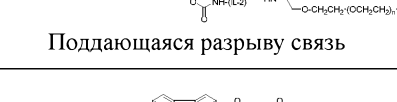
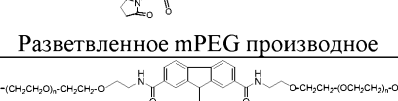
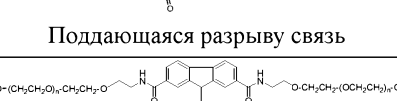
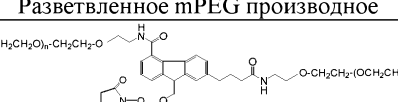
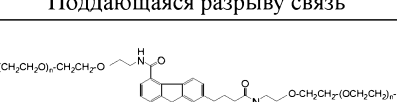
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Разветвленные mPEG2-N-гидроксисукцинимидные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Амидная связь</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH} \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Разветвленные mPEG2-альдегидные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH} \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \\ \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>
$\begin{array}{c} \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\ \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Гомобифункциональные PEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$(\text{IL-2})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидные связи</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Амидная связь</p>

 <p>Гомобифункциональные PEG-сукцинимидил-пропионатные реагенты</p>	 <p>Амидные связи</p>
 <p>mPEG-сукцинимидильные реагенты</p>	 <p>Амидная связь</p>
 <p>Разветвленные mPEG2-N-гидроксисукцинимидные реагенты</p>	 <p>Амидная связь</p>
 <p>Разветвленные mPEG2-N-гидроксисукцинимидные реагенты</p>	 <p>Амидная связь</p>
 <p>Реагенты mPEG-сложные тиозиферы</p>	 <p>Амидная связь (как правило, с компонентом IL-2 с N-концевым цистеином или гистидином)</p>
 <p>Гомобифункциональные PEG-пропиональдегидные реагенты</p>	 <p>Связи через вторичный амин</p>
 <p>mPEG-пропиональдегидные реагенты</p>	 <p>Связь через вторичный амин</p>
 <p>Гомобифункциональные PEG-бутиральдегидные реагенты</p>	 <p>Связи через вторичный амин</p>



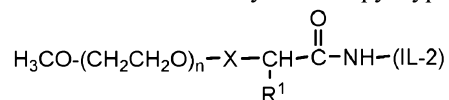
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ <p>mPEG-бутиральдегидные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Связь через вторичный амина</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ <p>mPEG-бутиральдегидные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Связь через вторичный амин</p>
$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \\ \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{HN} \\   \\ (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ <p>Гомобифункциональные PEG-бутиральдегидные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \\ \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \\ \text{HN} \\   \\ (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \end{array}$ <p>Связи через вторичный амин</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \\   \\ \text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ <p>Разветвленные mPEG2-бутиральдегидные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \\   \\ \text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \end{array}$ <p>Связь через вторичный амин</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \end{array}$ <p>Разветвленные mPEG2-бутиральдегидные реагенты</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2}) \end{array}$ <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{OCH}_2\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{NH}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ <p>mPEG-ацетальные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>mPEG-пиперидиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Связь через вторичный амин (с вторичным углеродом)</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_3$ <p>mPEG-метилкетонные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{NH}-(\text{IL-2})}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p>Связь через вторичный амин (с вторичным углеродом)</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ <p>mPEG-трезилатные реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-2})$ <p>Связь через вторичный амин</p>

$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG-малеимидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH&gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG-малеимидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH&gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG-малеимидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH&gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG вильчатые малеимидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH&gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Связи через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Разветвленные mPEG2-малеимидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH&gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Связь через вторичный амин</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2$ <p>mPEG-эпоксидные реагенты (при определенных условиях реакции, таких как pH &gt; 8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL}-2)$ <p>Связь через вторичный амин</p>

 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>
 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>
 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>
 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>
 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>
 <p>Разветвленное mPEG производное</p>	 <p>Поддающаяся разрыву связь</p>

Конъюгация полимерного реагента с аминогруппой компонента IL-2 может выполняться с помощью ряда методик. В одном подходе компонент IL-2 можно конъюгировать с полимерным реагентом, функционализированным сукцинимидильным производным (или другой активированной сложноэфирной группой, причем можно применять подходы, аналогичные описанным для этих альтернативных полимерных реагентов, содержащих активированную сложноэфирную группу). В этом подходе полимер, несущий сукцинимидильное производное, можно присоединять к компоненту IL-2 в водной среде при pH 7-9,0, хотя применение отличающихся условий реакции (например, более низкого pH, такого как 6-7, или различных температур и/или меньше 15°C) может приводить к прикреплению полимера к отличающемуся положению на компоненте IL-2. К тому же амидная связь может образоваться при вступлении непептидного водорастворимого полимера с концевой аминогруппой в реакцию с компонентом IL-2, несущим активирующую группу карбоновой кислоты.

Иллюстративные конъюгаты охватываются следующей структурой:



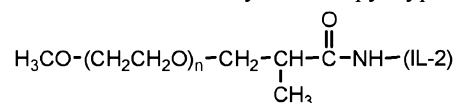
где n представляет собой целое число со значением от 2 до 4000;

X представляет собой спейсерный компонент;

R<sup>1</sup> представляет собой органический радикал; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Иллюстративные конъюгаты охватываются следующей структурой:

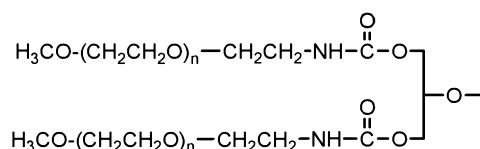


где n представляет собой целое число со значением от 2 до 4000 и IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Типичным другим подходом, применимым для конъюгирования компонента IL-2 с полимерным реагентом, является применение восстановительного аминирования для конъюгирования первичного амина компонента IL-2 с полимерным реагентом, функционализированным кетоном, альдегидом или их гидра-

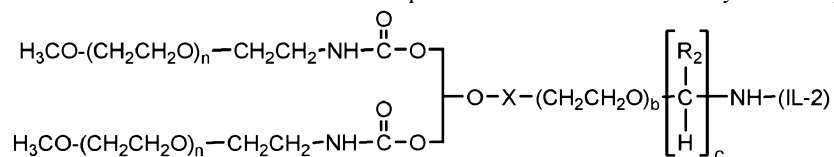
тированной формой (например, гидратом кетона, гидратом альдегида). В этом подходе первичный амин из компонента IL-2 реагирует с карбонильной группой альдегида или кетона (или соответствующей гидроксил-содержащей группой гидратированного альдегида или кетона), при этом образуя Шиффово основание. Шиффово основание затем, в свою очередь, может восстановлением превращаться в устойчивый конъюгат посредством применения восстанавливающего средства, такого как борогидрид натрия. Возможны селективные реакции (например, на N-конце), в частности с полимером, функционализированным кетоном или разветвленным  $\alpha$ -метил альдегидом и/или при специфических условиях реакции (например, пониженном pH).

Иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения, где водорастворимый полимер представлен в разветвленной форме, включают таковые, в которых водорастворимый полимер охватывается следующей структурой:



где каждый n независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000.

Иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения охватываются следующей структурой:



где каждый (n) независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000;

X представляет собой спейсерный компонент;

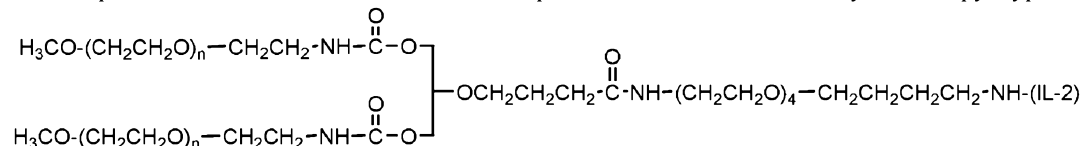
b представляет собой целое число со значением 2-6;

c представляет собой целое число со значением 2-6;

R<sup>2</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или низший алкил; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

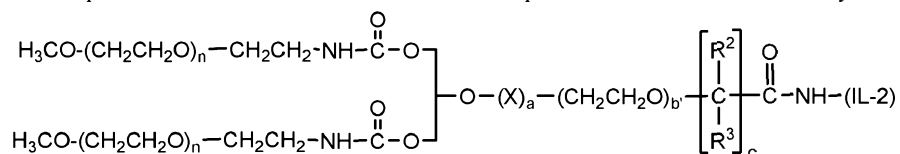
Иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения охватываются следующей структурой:



где каждый (n) независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Другие иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения охватываются следующей структурой:



где каждый n независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000;

a равняется или нулю, или единице;

X, если присутствует, представляет собой спейсерный компонент, включающий один или несколько атомов;

b' равняется нулю или представляет собой целое число со значением от одного до десяти;

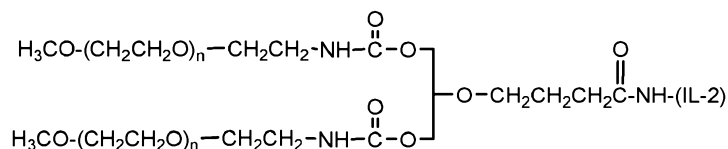
c представляет собой целое число со значением от одного до десяти;

R<sup>2</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или органический радикал;

R<sup>3</sup> в каждом случае независимо представляет собой H или органический радикал; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

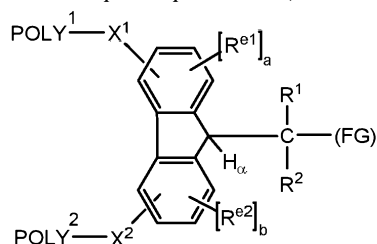
Еще дополнительные иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения охватываются следующей структурой:



где каждый n независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Иллюстративные конъюгаты, которые содержат поддающуюся разрыву связь, включают те, у которых компонент IL-2 конъюгирован с полимерным реагентом, охваченным следующей формулой:



где POLY<sup>1</sup> представляет собой первый водорастворимый полимер;

POLY<sup>2</sup> представляет собой второй водорастворимый полимер;

X<sup>1</sup> представляет собой первый спейсерный компонент;

X<sup>2</sup> представляет собой второй спейсерный компонент;

H<sub>α</sub> представляет собой ионизируемый атом водорода;

R<sup>1</sup> представляет собой H или органический радикал;

R<sup>2</sup> представляет собой H или органический радикал;

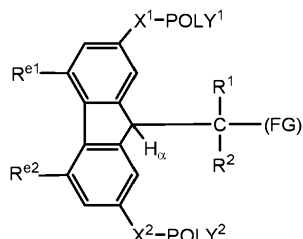
a равняется или нулю, или единице;

b равняется или нулю, или единице;

R<sup>e1</sup>, если присутствует, представляет собой первую группу, меняющую электронную плотность;

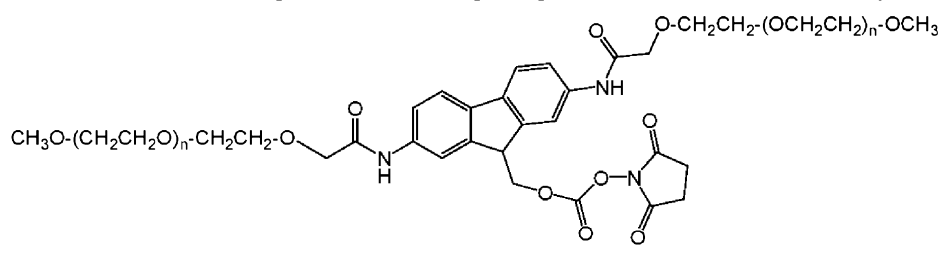
R<sup>e2</sup>, если присутствует, представляет собой вторую группу, меняющую электронную плотность; и

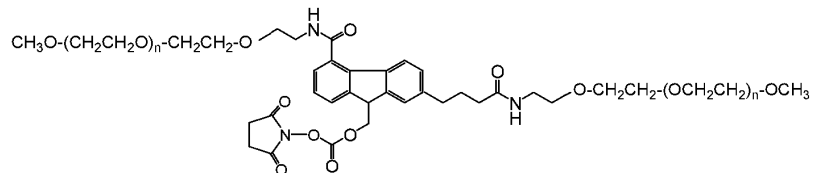
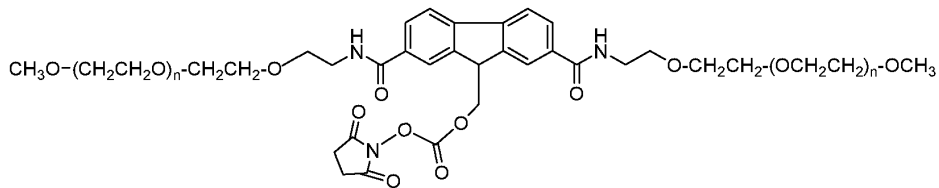
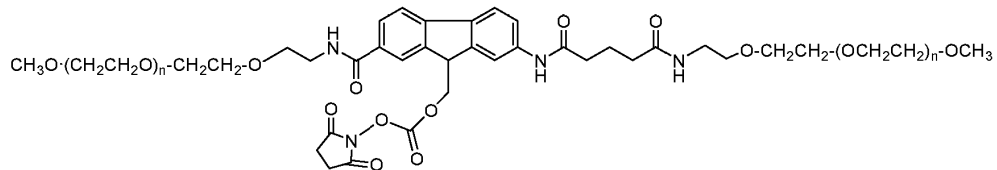
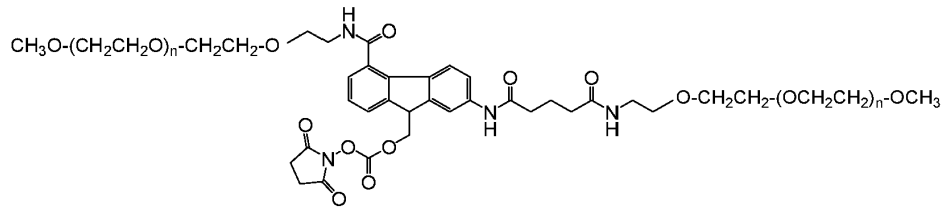
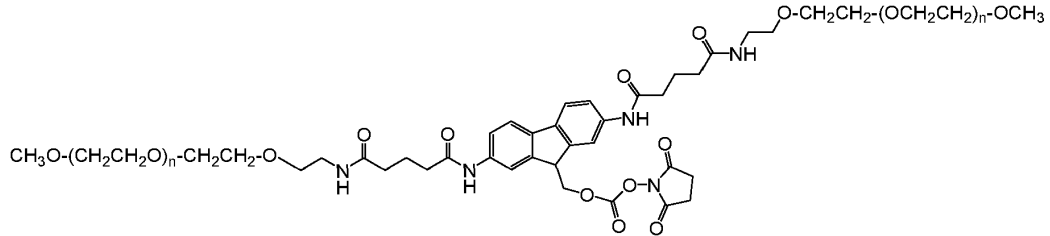
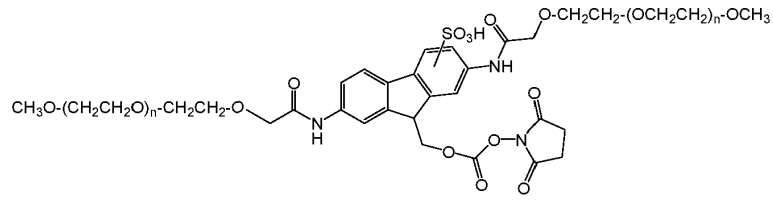
(FG) представляет собой функциональную группу, способную реагировать с аминогруппой активного средства с образованием поддающейся разрыву связи, такой как карбаматная связь. В пределах этой формулы предусматриваются полимерные реагенты с более определенной структурой:



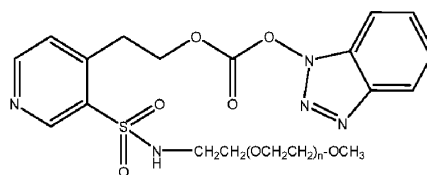
где каждый из POLY<sup>1</sup>, POLY<sup>2</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, H<sub>α</sub> и (FG) представляет собой такой, как определено ранее, и R<sup>e1</sup> представляет собой первую группу, меняющую электронную плотность; и R<sup>e2</sup> представляет собой вторую группу, меняющую электронную плотность.

Еще дополнительные иллюстративные полимерные реагенты подпадают под следующие формулы:





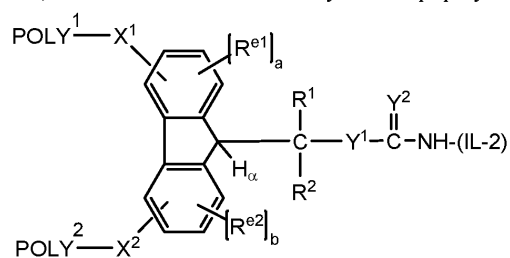
И



где для каждой структуры и в каждом случае  $n$  независимо представляет собой целое число от 4 до 1500.

Эти полимерные реагенты, обеспечивающие поддающуюся разрыву связь, можно получать в соответствии с процедурами, изложенными в публикации заявки на патент США № 2006/0293499.

Иллюстративные конъюгаты, образованные при применении полимерных реагентов, обеспечивающих поддающуюся разрыву связь, включают таковые следующей формулы:



где POLY<sup>1</sup> представляет собой первый водорастворимый полимер;

POLY<sup>2</sup> представляет собой второй водорастворимый полимер;

X<sup>1</sup> представляет собой первый спейсерный компонент;

X<sup>2</sup> представляет собой второй спейсерный компонент;

H<sub>α</sub> представляет собой ионизируемый атом водорода;

R<sup>1</sup> представляет собой H или органический радикал;

R<sup>2</sup> представляет собой H или органический радикал;

a равняется или нулю, или единице;

b равняется или нулю, или единице;

R<sup>e1</sup>, если присутствует, представляет собой первую группу, меняющую электронную плотность;

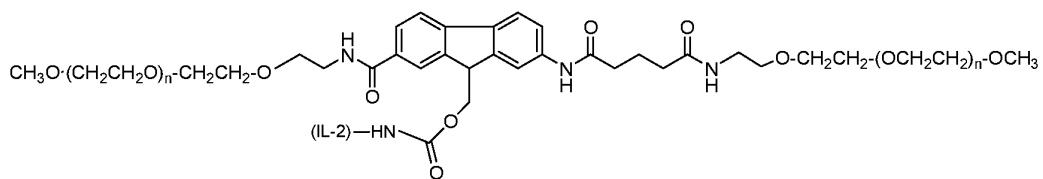
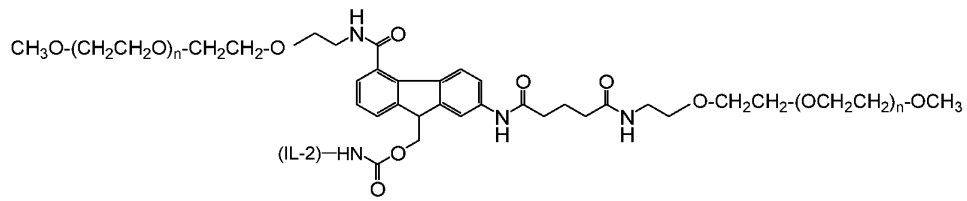
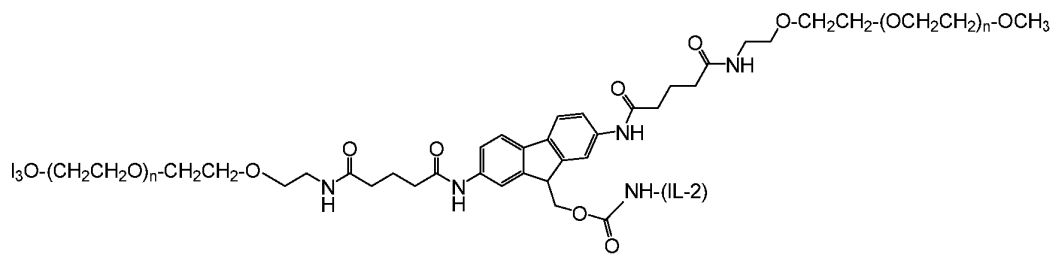
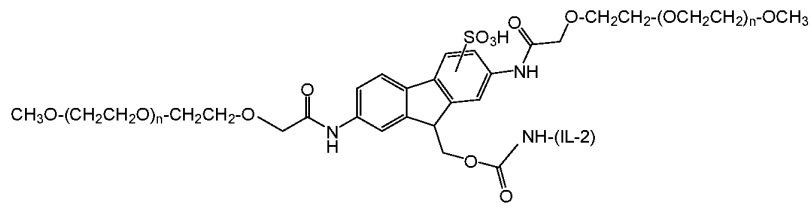
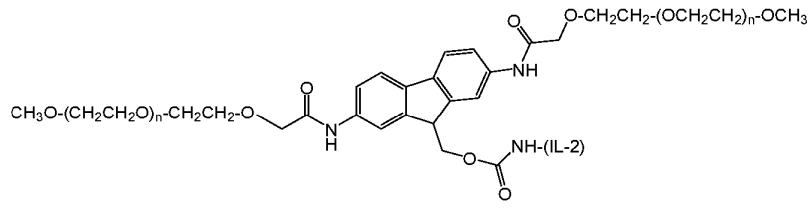
R<sup>e2</sup>, если присутствует, представляет собой вторую группу, меняющую электронную плотность;

Y<sup>1</sup> представляет собой O или S;

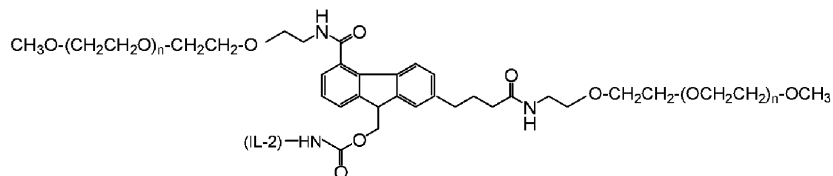
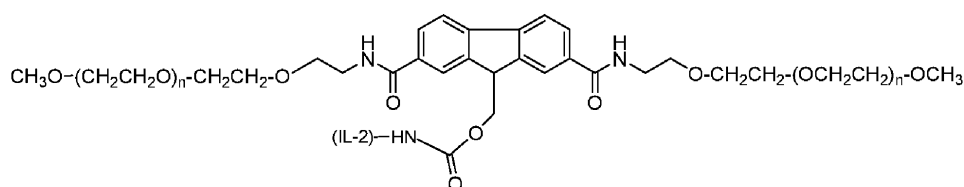
Y<sup>2</sup> представляет собой O или S; и

(IL-2) представляет собой остаток компонента IL-2.

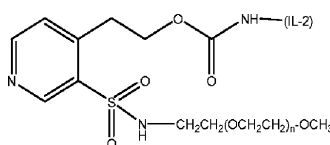
Иллюстративные конъюгаты имеют следующую структуру:





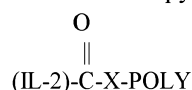


И



где для каждой структуры и в каждом случае  $n$  независимо представляет собой целое число от 4 до 1500, и (IL-2) представляет собой остаток компонента IL-2.

Карбоксильные группы представляют другую функциональную группу, которая может служить в качестве точки прикрепления на компоненте IL-2. Структурно, конъюгат будет содержать следующее:



где (IL-2) и смежная карбонильная группа соответствуют карбоксилсодержащему компоненту IL-2, X представляет собой связь, предпочтительно гетероатом, выбранный из O, N(H) и S, и POLY представляет собой водорастворимый полимер, такой как PEG, необязательно оканчивающийся концевым блокирующим компонентом.

Связь C(O)-X образуется в результате реакции между полимерным производным, несущим концевую функциональную группу, и карбоксилсодержащим компонентом IL-2. Как отмечалось выше, конкретная связь будет зависеть от типа использованной функциональной группы. Если полимер является функционализированным на конце или "активированным" гидроксильной группой, образующаяся в результате связь будет представлять собой сложноэфирную связь карбоновой кислоты и X будет O. Если полимерная главная цепь функционализирована тиольной группой, образующаяся в результате связь будет представлять собой связь через сложный тиоэфир и X будет S. При использовании определенных многоплечих, разветвленных или вильчатых полимеров компонент C(O)X и, в частности, компонент X может быть относительно более сложным и может включать более длинную структуру связи.

Водорастворимые производные, содержащие гидразидный компонент, также применимы для конъюгации на карбониле и карбоновой кислоте. В случае если компонент IL-2 не содержит карбонильный компонент или карбоновую кислоту, его можно добавить с применением методик, известных специалисту в данной области. Например, карбонильный компонент можно вводить с помощью восстановления карбоновой кислоты (например, C-концевой карбоновой кислоты) и/или с помощью обеспечения гликозилированных или гликированных (где добавленные сахара имеют карбонильный компонент) видов компонента IL-2. Что касается компонентов IL-2, содержащих карбоновую кислоту, PEG-гидразиновый реагент может, в присутствии связывающего средства (например, DCC), ковалентно присоединяться к компоненту IL-2 [например, mPEG-OCH<sub>2</sub>C(O)NHNH<sub>2</sub> + HOC(O)-(IL-2) приводит в результате к mPEG-OCH<sub>2</sub>C(O)NHNHC(O)-IL-2]. Конкретные примеры водорастворимых производных, содержащих гидразидный компонент, вместе с соответствующими конъюгатами представлены в табл. 2 ниже. К тому же любое водорастворимое производное, содержащее активированный сложный эфир (например, сукцинимидильную группу), чтобы содержать гидразидный компонент может превращаться с помощью реакции содержащего активированный сложный эфир производного водорастворимого полимера с гидразином (NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) или трет-бутилкарбазатом [NH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. В таблице переменная  $n$  представляет количество повторяющихся мономерных единиц, и "-C(O)-(IL-2)" представляет остаток компонента IL-2 после конъюгации с полимерным реагентом. Необязательно, гидразидная связь может восстанавливаться при применении подходящего восстанавливающего средства. Несмотря на то что каждая полимерная часть [например, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> или (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>], представленная в табл. 2, оканчивается группой

"CH<sub>3</sub>", она может быть замещена другими группами (такими как Н и бензил).

Таблица 2. Полимерные реагенты, специфические в отношении карбоксила, и образованный из них конъюгат с компонентом IL-2

Полимерный реагент	Соответствующий конъюгат
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-2)$ <p>Гидразоновая связь</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-гидразиновые реагенты</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{IL}-2)$ <p>Связь C(O)NHNHC(O)</p>

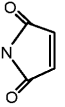
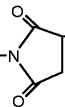
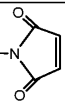
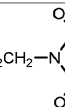


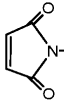
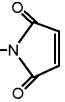
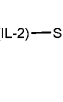
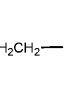




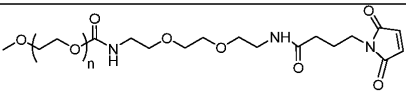
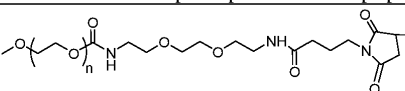


Тиоловые группы, содержащиеся в пределах компонента IL-2, могут служить эффективными сайтами прикрепления для водорастворимого полимера. В частности, цистеиновые остатки обеспечивают тиоловые группы, когда компонент IL-2 представляет собой белок. Тиоловые группы в таких цистеиновых остатках затем могут реагировать с активированным PEG, что является специфичным для реакции с тиоловыми группами, например N-малеимидильный полимер или другие производные, описываемые в патенте США № 5739208 и в WO 01/62827. К тому же защищенный тиол можно вводить в олигосахаридную боковую цепь активированного гликопротеина с последующим снятием защиты с помощью тиол-реакционноспособного водорастворимого полимера.

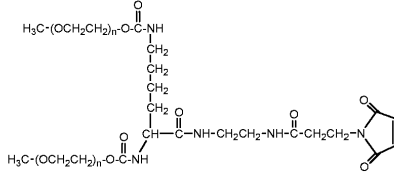
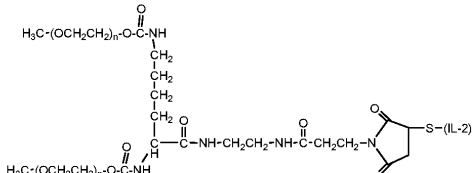
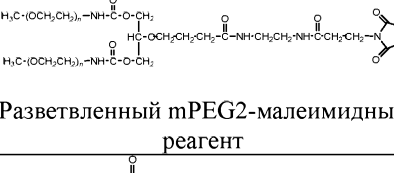
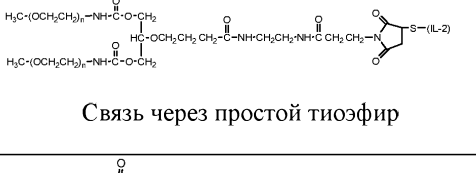
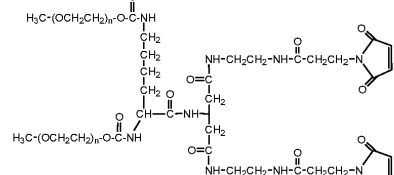
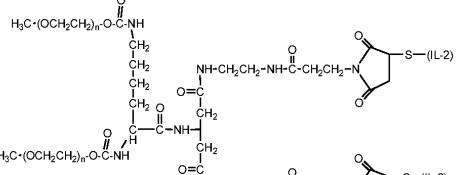
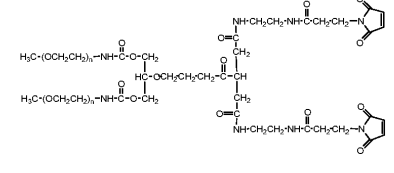
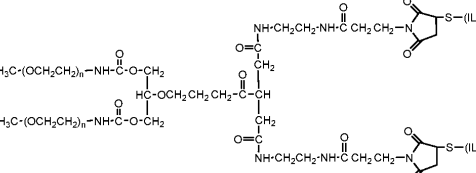
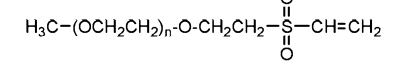
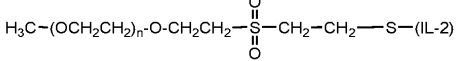
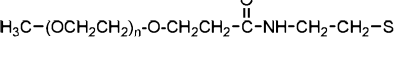
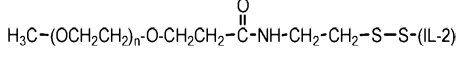
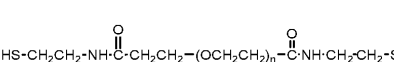
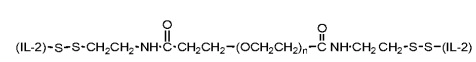
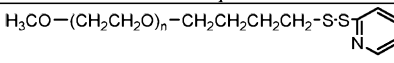
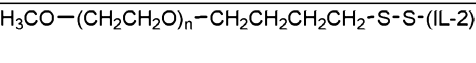
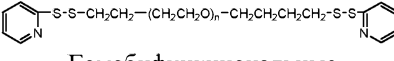
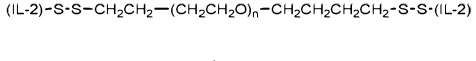
Конкретные примеры реагентов вместе с соответствующим конъюгатом представлены в табл. 3 ниже. В таблице переменная n представляет количество повторяющихся мономерных единиц, и "-S-(IL-2)" представляет остаток компонента IL-2 после конъюгации с водорастворимым полимером. Несмотря на

то что каждая полимерная часть [например,  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$  или  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ], представленная в табл. 3, оканчивается группой "CH<sub>3</sub>", она может быть замещена другими группами (такими как H и бензил).

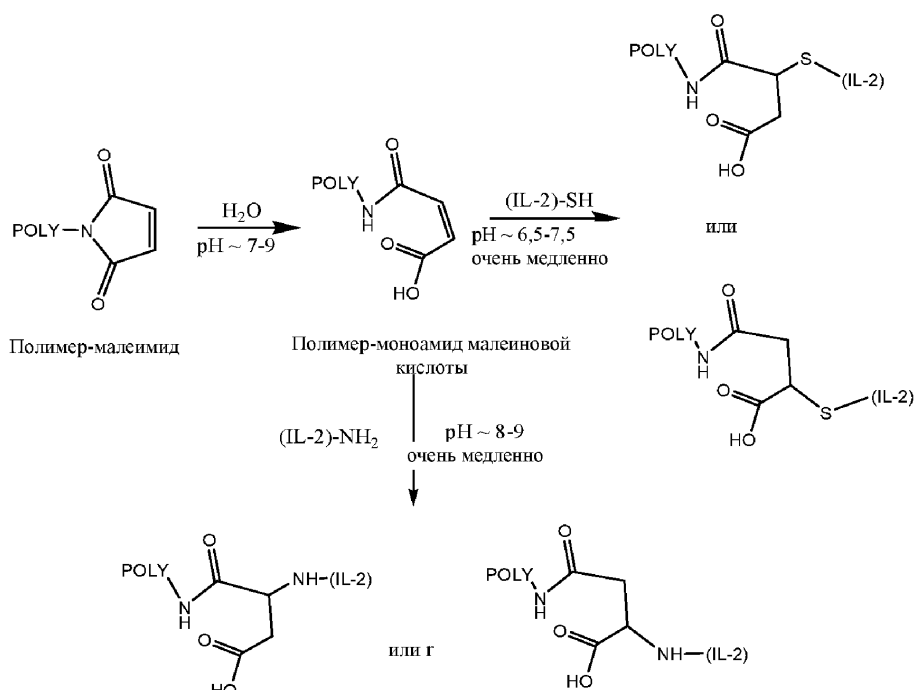
В отношении SEQ ID NO: 1 и 2, соответствующих иллюстративным компонентам IL-2, можно видеть, что имеется цистеиновый остаток в положении 125. Таким образом, иллюстративным тиоловым сайтом прикрепления является цистеин, расположенный в положении 125. Хотя предпочтительно не нарушать никакие дисульфидные связи, ассоциированные с указанным компонентом IL-2, можно присоединить полимер в пределах боковой цепи одного или нескольких из этих цистеиновых остатков и сохранить степень активности. К тому же возможно добавить цистеиновый остаток к компоненту IL-2 с применением традиционных методик синтеза. См., например, процедуру, описанную в WO 90/12874 относительно добавления цистеиновых остатков, при этом такая процедура может адаптироваться для компонента IL-2. К тому же традиционные способы генетической инженерии также могут применяться для введения цистеинового остатка в компонент IL-2. В некоторых вариантах осуществления, однако, предпочтительно не вводить дополнительный цистеиновый остаток и/или тиоловую группу.

Таблица 3. Полимерные реагенты, селективные в отношении тиола, и образованный из них конъюгат с компонентом IL-2

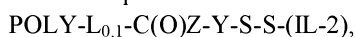
Полимерный реагент	Соответствующий конъюгат
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG-малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG-малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG-малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  Гомобифункциональный mPEG-малеимидный реагент	 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  Связь через простой тиоэфир
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG-малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG-малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир
 mPEG-малеимидный реагент	 Связь через простой тиоэфир
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG вильчатый малеимидный реагент	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  Связь через простой тиоэфир

 <p>Разветвленный mPEG2-малеимидный реагент</p>	 <p>Связь через простой тиоэфир</p>
 <p>Разветвленный mPEG2-малеимидный реагент</p>	 <p>Связь через простой тиоэфир</p>
 <p>Разветвленный mPEG2 вильчатый малеимидный реагент</p>	 <p>Связи через простой тиоэфир</p>
 <p>Разветвленный mPEG2 вильчатый малеимидный реагент</p>	 <p>Связи через простой тиоэфир</p>
 <p>mPEG-винилсульфоновый реагент</p>	 <p>Связь через простой тиоэфир</p>
 <p>mPEG-тиоловый реагент</p>	 <p>Дисульфидная связь</p>
 <p>Гомобифункциональный PEG-тиоловый реагент</p>	 <p>Дисульфидные связи</p>
 <p>mPEG-дисульфидный реагент</p>	 <p>Дисульфидная связь</p>
 <p>Гомобифункциональные дисульфидные реагент</p>	 <p>Дисульфидные связи</p>

В образовании конъюгатов, образованных из водорастворимых полимеров, несущих одну или несколько малеимидных функциональных групп (независимо от того реагирует ли малеимид с аминогруппой или тиоловой группой на компоненте IL-2), соответствующая форма(ы) моноамида малеиновой кислоты водорастворимого полимера также может реагировать с компонентом IL-2. При конкретных условиях (например, pH приблизительно 7-9 и в присутствии воды) малеимидное кольцо будет "раскрываться" с образованием соответствующего моноамида малеиновой кислоты. Моноамид малеиновой кислоты, в свою очередь, может реагировать с амином или тиоловой группой компонента IL-2. Иллюстративные реакции на основе моноамида малеиновой кислоты схематически показаны ниже. POLY представляет водорастворимый полимер, и (IL-2) представляет компонент IL-2.

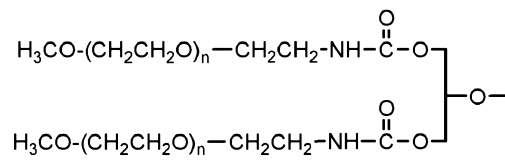


Типичный конъюгат в соответствии с изобретением может иметь следующую структуру:



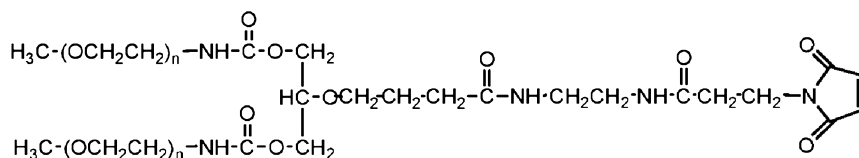
где POLY представляет собой водорастворимый полимер, L представляет собой необязательный линкер, Z представляет собой гетероатом, выбранный из группы, включающей O, NH и S, и Y выбирают из группы, включающей C<sub>2-10</sub> алкил, C<sub>2-10</sub> замещенный алкил, арил и замещенный арил, и (IL-2) представляет собой компонент IL-2. Полимерные реагенты, которые могут реагировать с компонентом IL-2 и приводить в результате к этому типу конъюгата, описаны в публикации заявки на патент США № 2005/0014903.

Как отмечалось ранее, иллюстративные конъюгаты настоящего изобретения, где водорастворимый полимер находится в разветвленной форме, будут иметь разветвленную форму водорастворимого полимера, образующего следующую структуру:

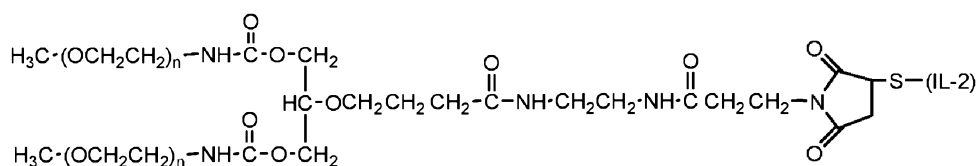


где каждый n независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000.

Иллюстративные конъюгаты с водорастворимым полимером в разветвленной форме получают с применением следующего реагента:



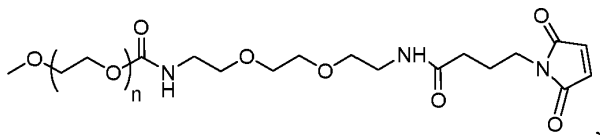
таким образом, образуется конъюгат со следующей структурой:



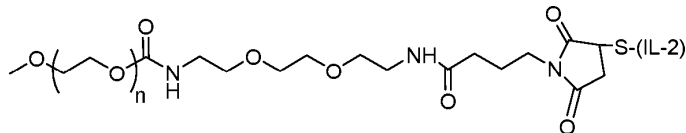
где (для каждой структуры) каждый n независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000; и

IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Дополнительный иллюстративный конъюгат можно образовать с применением реагента



таким образом, образуется конъюгат со следующей структурой:



где (для каждой структуры)  $n$  независимо представляет собой целое число со значением от 2 до 4000; и IL-2 представляет собой остаток компонента IL-2.

Конъюгаты можно образовать с применением полимерных реагентов, селективных в отношении тиола, рядом способов, и настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении. Например, компонент IL-2, необязательно в подходящем буфере (в том числе амин-содержащих буферах, при необходимости), помещают в водную среду при pH приблизительно 7-8 и добавляют полимерный реагент, селективный в отношении тиола, в молярном избытке. Реакцию проводят в течение приблизительно 0,5-2 ч, хотя время реакции может составлять больше 2 ч (например, 5, 10, 12 и 24 ч), если определяют, что выходы продуктов ПЭГилирования относительно низкие. Иллюстративные полимерные реагенты, которые могут применяться в этом подходе, представляют собой полимерные реагенты, несущие реакционноспособную группу, выбранную из группы, включающей мелаимид, сульфен (например, винилсульфон) и тиол (например, функционализированные тиолы, такие как ортопиридинил или "OPSS").

Что касается полимерных реагентов, то описываемые в данном документе или где-либо еще можно приобрести у коммерческих источников или получить из коммерчески доступных исходных материалов. К тому же способы получения полимерных реагентов описаны в литературе.

Прикрепление компонента IL-2 и непептидного водорастворимого полимера может быть прямым, при котором никаких промежуточных атомов не расположено между компонентом IL-2 и полимером, или непрямым, при котором один или несколько атомов расположены между компонентом IL-2 и полимером. Что касается непрямого прикрепления, "спейсерный компонент" служит в качестве линкера между остатком компонента IL-2 и водорастворимым полимером. Один или несколько атомов, составляющих спейсерный компонент, могут включать один или несколько из атомов углерода, атомов азота, атомов серы, атомов кислорода и их комбинации. Спейсерный компонент может содержать амидную, вторичную аминную, карбаматную группу, группу простого тиоэфира и/или дисульфидную группу. Неограничивающие примеры конкретных спейсерных компонентов включают такие, которые выбирают из группы, состоящей из  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-NH-$ ,  $-NH-C(O)-NH-$ ,  $-O-C(O)-NH-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-$ ,  $-O-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-$ ,  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ ,  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ ,  $-C(O)-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-O-CH_2-$ ,  $-C(O)-O-CH_2-CH_2-$ ,  $-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-O-C(O)-NH-CH_2-$ ,  $-O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-NH-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ ,  $-C(O)-CH_2-$ ,  $-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ ,  $-O-C(O)-NH-[CH_2]_h-$  ( $OCH_2CH_2$ ) $_j$ , двухвалентной циклоалкильной группы,  $-O-$ ,  $-S-$ , аминокислоты,  $-N(R^6)$ - и комбинаций двух или больше из любого из вышеперечисленного, где  $R^6$  представляет собой H или органический радикал, выбранный из группы, включающей алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, арил и замещенный арил, (h) равняется от нуля до шести, и (j) равняется от нуля до 20. Другие конкретные спейсерные компоненты имеют следующие структуры:  $-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ ,  $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$  и  $-O-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ , где значения нижнего индекса, следующие за каждым метиленом, указывают на количество метиленов, содержащихся в структуре, например,  $(CH_2)_{1-6}$  означает, что структура может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 метиленов. В дополнение, любой из вышеприведенных спейсерных компонентов может дополнительно включать олигомерную цепь из этиленоксида, содержащую 1-20 мономерных единиц этиленоксида [т.е.  $-(CH_2CH_2O)_{1-20}$ ]. Т.е. олигомерная цепь из этиленоксида может находиться перед или после спейсерного компонента и необязательно между любыми двумя атомами спейсерного компонента, содержащего два или более атомов. Также, олигомерную цепь не следует считать частью спейсерного компонента, если олигомер смежный с

полимерным сегментом и просто представляет продолжение полимерного сегмента.

#### Композиции.

Конъюгаты, как правило, представляют собой часть композиции. В целом, композиция содержит несколько конъюгатов, предпочтительно, хотя не обязательно, каждый конъюгат содержит одинаковый компонент IL-2 (т.е. во всей композиции обнаруживается только один тип компонента IL-2). К тому же композиция может содержать несколько конъюгатов, где любой указанный конъюгат содержит компонент, выбранный из группы, включающей два или более различных компонентов IL-2 (т.е. во всей композиции обнаруживаются два или более различных компонентов IL-2). Однако оптимально, чтобы большинство конъюгатов в композиции (например, 85% или более из совокупности конъюгатов в композиции) включали одинаковый компонент IL-2.

Композиция может содержать единственный вид конъюгата (например, моноПЭГилованный конъюгат, где отдельный полимер прикрепляется в одинаковом положении касательно большинства конъюгатов в композиции) или смесь из видов конъюгатов (например, смесь из моноПЭГилованных конъюгатов, где прикрепление полимера происходит в различных сайтах, и/или смесь моноПЭГилованных, диПЭГилованных и триПЭГилованных конъюгатов). Композиции также могут содержать другие конъюгаты с четырьмя, пятью, шестью, семью, восьмью или более полимерами, прикрепленными к любому указанному компоненту с активностью IL-2. К тому же настоящее изобретение включает случаи, когда композиция содержит несколько конъюгатов, причем каждый конъюгат содержит один водорастворимый полимер, ковалентно прикрепленный к одному компоненту IL-2, а также композиции, содержащие два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более водорастворимых полимеров, ковалентно прикрепленных к одному компоненту IL-2.

Что касается конъюгатов в композиции, композиция будет отвечать требованиям одной или нескольким из следующих характеристик: по меньшей мере приблизительно 85% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до четырех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 85% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до трех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 85% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до двух полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 85% конъюгатов в композиции будут иметь один полимер, прикрепленный к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 95% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до пяти полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 95% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до четырех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 95% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до трех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 95% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до двух полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 95% конъюгатов в композиции будут иметь один полимер, прикрепленный к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 99% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до пяти полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 99% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до четырех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 99% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до трех полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; по меньшей мере приблизительно 99% конъюгатов в композиции будут иметь от одного до двух полимеров, прикрепленных к компоненту IL-2; и по меньшей мере приблизительно 99% конъюгатов в композиции будут иметь один полимер, прикрепленный к компоненту IL-2. Понятно, что ссылка на диапазон полимеров, например "от x до y полимеров", подразумевает количество полимеров от x до y включительно (т.е., например, "от одного до трех полимеров" подразумевает один полимер, два полимера и три полимера, "от одного до двух полимеров" подразумевает один полимер и два полимера и т.д.).

В одном или нескольких вариантах осуществления, предпочтительно, чтобы композиция, содержащая конъюгат, не содержала или по существу не содержала альбумин. Также предпочтительно, чтобы композиция не содержала или по существу не содержала белков, не обладающих активностью IL-2. Таким образом, предпочтительно, чтобы 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно 99% композиции не содержало альбумин. В дополнение, предпочтительно, чтобы 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно 99% композиции не содержало какого-либо белка, не обладающего активностью IL-2. В тех случаях, когда альбумин присутствует в композиции, иллюстративные композиции настоящего изобретения по существу не содержат конъюгаты, содержащие поли(этиленгликолевый) полимер, соединяющий остаток компонента IL-2 с альбумином.

В торговой марке PROLEUKIN® альдеслейкина (доступен от Prometheus Laboratories Inc., Сан-Диего, Калифорния) IL-2 предусматривается в комбинации с додецилсульфатом натрия ("SDS"). В отличие от этого для композиций настоящего изобретения преимущественно может не требоваться SDS и, следовательно, они не содержат (или по существу не содержат) SDS, а также в большинстве случаев детергенты (например, Tween 20 и Tween 80). Вследствие этого композиции и конъюгаты настоящего изобретения можно получать без проведения этапа добавления SDS, Tween 20 и Tween 80. К тому же композиции и конъюгаты настоящего изобретения можно получать без проведения этапа добавления детергента или другого наполнителя. Кроме того, композиции настоящего изобретения не содержат или по суще-

ству не содержат (например, меньше приблизительно 20%, более предпочтительно меньше приблизительно 15%, еще более предпочтительно меньше приблизительно 10%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 9%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 8%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 7%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 6%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 5%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 4%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 3%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 2%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 1%, все еще более предпочтительно меньше приблизительно 0,5%, с наиболее предпочтительным меньше 0,001%) детергентов, таких как SDS, Tween 20 и Tween 80. К тому же композиции и конъюгаты настоящего изобретения можно получать без проведения этапа удаления (с помощью, например, ультрафильтрации) детергентов, таких как SDS, Tween 20 и Tween 80. Кроме того, композиции и конъюгаты настоящего изобретения можно получать без проведения этапа удаления (с помощью, например, ультрафильтрации) детергента.

Контроль требуемого количества полимеров в отношении любого указанного компонента может достигаться с помощью выбора подходящего полимерного реагента, соотношения полимерного реагента к компоненту IL-2, температуры, условий pH и других аспектов реакции конъюгации. К тому же с помощью способов очистки можно достигнуть уменьшения или исключения нежелательных конъюгатов (например, конъюгатов, которые имеют четыре или больше прикрепленных полимеров).

Например, конъюгаты полимер-компонент IL-2 можно очищать для получения/выделения различных конъюгированных видов. В частности, смесь продуктов можно очищать с получением среднего в пределах одного, двух, трех, четырех, пяти или более PEG на компонент IL-2, как правило, один, два или три PEG на компонент IL-2. Алгоритм очистки конечной реакционной смеси конъюгата будет зависеть от ряда факторов, в том числе, например, молекулярной массы использованного полимерного реагента, определенного компонента IL-2, требуемого режима дозирования и остаточной активности и *in vivo* свойств отдельного конъюгата(ов).

При необходимости, конъюгаты с различными молекулярными массами можно выделять с применением гельфильтрационной хроматографии и/или ионообменной хроматографии. А именно, гельфильтрационную хроматографию применяют для фракционирования соотношений с различным числом полимеров на компонент IL-2 (например, 1-mer, 2-mer, 3-mer и т. д., где "1-mer" указывает на 1 полимер на компонент IL-2, "2-mer" указывает на два полимера на компонент IL-2 и так далее) на основании их отличающихся молекулярных масс (где отличие, по сути, соответствует средней молекулярной массе части водорастворимого полимера). Например, в иллюстративной реакции, где белок с массой 35000 Да случайным образом конъюгируют с полимерным реагентом молекулярной массы приблизительно 20000 Да, образующаяся в результате реакционная смесь может содержать немодифицированный белок (с молекулярной массой приблизительно 35000 Да), моноПЭГилированный белок (с молекулярной массой приблизительно 55000 Да), диПЭГилированный белок (с молекулярной массой приблизительно 75000 Да) и т.д.

Хотя этот подход можно применять для разделения PEG и других конъюгатов полимер-компонент IL-2 с отличающимися молекулярными массами, этот подход в целом неэффективен для разделения позиционных изоформ с различными сайтами прикрепления полимеров в пределах компонента IL-2. Например, гельфильтрационную хроматографию можно применять для отделения друг от друга смесей из 1-mers, 2-mers, 3-mers PEG и т.д., хотя каждая из получаемых композиций конъюгата может содержать PEG, прикрепленные к различным реакционноспособным группам (например, лизиновым остатками) в пределах компонента IL-2.

Гельфильтрационные колонки, подходящие для проведения разделения этого типа, включают колонки Superdex™ и Sephadex™, доступные от Amersham Biosciences (Пискатауэй, Нью-Джерси). Выбор конкретной колонки будет зависеть от требуемого диапазона требуемого фракционирования. Элюирование в целом проводят с применением подходящего буфера, такого как фосфатный, ацетатный или подобный. Собранные фракции можно анализировать с помощью ряда различных способов, например, (i) поглощения при 280 нм на содержание белка, (ii) анализа белка, основанного на красителе, с применением бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта, (iii) тестирования с йодом на содержание PEG (Sims et al. (1980) Anal. BioIL-2m, 107:60-63), (iv) электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS PAGE) с последующим окрашиванием йодидом бария и (v) высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Разделение позиционных изоформ проводят с помощью обращенно-фазовой хроматографии с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) с применением подходящей колонки (например, колонки C18 или колонки C3, коммерчески доступных от компаний, таких как Amersham Biosciences или Vydac) или с помощью ионообменной хроматографии с применением ионообменной колонки, например, ионообменной колонки Sepharose™, доступной от Amersham Biosciences. Тот или иной подход можно применять для разделения изомеров полимер-активное средство с одинаковой молекулярной массой (т.е. позиционных изоформ).

Композиции предпочтительно по существу не содержат белки, не обладающие активностью IL-2. К



тому же композиции предпочтительно по существу не содержат всех иных нековалентно прикрепленных водорастворимых полимеров. При некоторых обстоятельствах, однако, композиция может содержать смесь из конъюгатов полимер-компонент IL-2 и неконъюгированного компонента IL-2.

Необязательно, композиция настоящего изобретения дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. При необходимости фармацевтически приемлемый наполнитель можно добавлять к конъюгату для образования композиции.

Иллюстративные наполнители включают, без ограничения, выбираемые из группы, состоящей из углеводов, неорганических солей, противомикробных средств, антиоксидантов, поверхностно-активных веществ, буферов, кислот, оснований, аминокислот и их комбинаций.

В качестве наполнителя может присутствовать углевод, такой как сахар, полученное производное сахара, такое как альдит, альдоновая кислота, этерифицированный сахар и/или полимер сахаров. Конкретные углеводные наполнители включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), пиранозилсорбит, миоинозит, циклодекстрины и т.п.

Наполнитель также могут включать неорганическую соль или буфер, такие как лимонная кислота, хлорид натрия, хлорид калия, сульфат натрия, нитрат калия, одноосновный фосфат натрия, двухосновный фосфат натрия и их комбинации.

Композиция также может включать противомикробное средство для предупреждения или замедления роста микроорганизмов. Неограничивающие примеры противомикробных средств, подходящих для одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения, включают хлорид бензалкония, хлорид бензетония, бензиловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорбутанол, фенол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути, тимеросал и их комбинации.

Также в композиции может присутствовать антиоксидант. Антиоксиданты применяются для предотвращения окисления, таким образом, предупреждая разложение конъюгата или других компонентов препарата. Подходящие антиоксиданты для применения в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения включают, например, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, фосфорноватистую кислоту, моноиоглицерин, пропилгаллат, бисульфит натрия, формальдегидсульфоксилат натрия, метабисульфит натрия и их комбинации.

В качестве наполнителя может присутствовать поверхностно-активное вещество. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты, такие как "Tween 20" и "Tween 80," и плуроники, такие как F68 и F88 (оба из которых доступны от BASF, Маунт Олив, Нью-Джерси); сложные эфиры сорбитана; липиды, такие как фосфолипиды, такие как лецитин и другие фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины (хотя предпочтительно в нелипосомальной форме), жирные кислоты и сложный эфир жирных кислот; стероиды, такие как холестерин; и IL-2ирующие средства, такие как EDTA, цинк и другие такие подходящие катионы.

В качестве наполнителя в композиции могут присутствовать кислоты или основания. Неограничивающие примеры кислот, которые можно применять, включают кислоты, выбранные из группы, состоящей из соляной кислоты, уксусной кислоты, фосфорной кислоты, лимонной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты, муравьиной кислоты, трихлоруксусной кислоты, азотной кислоты, хлорной кислоты, фосфорной кислоты, серной кислоты, фумаровой кислоты и их комбинаций. Примеры подходящих оснований включают, без ограничения, основания, выбранные из группы, состоящей из гидроксида натрия, ацетата натрия, гидроксида аммония, гидроксида калия, ацетата аммония, ацетата калия, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия, формиата натрия, сульфата натрия, сульфата калия, фумарата калия и их комбинации.

В качестве наполнителя в композициях, описанных в данном документе, может присутствовать одна или несколько аминокислот. Иллюстративные аминокислоты при этом включают аргинин, лизин и глицин.

Количество конъюгата (т.е. конъюгата, образованного активным средством и полимерным реагентом) в композиции будет варьировать в зависимости от ряда факторов, но оптимально будет представлять собой терапевтически эффективную дозу, если композиция сохраняется в контейнере со стандартной дозой (например, в ампуле). К тому же фармацевтический препарат можно помещать в шприц. Терапевтически эффективную дозу можно определять экспериментально с помощью повторных введений возрастающих количеств конъюгата для определения того, какое количество дает клинически требуемый ожидаемый результат.

Количество любого отдельного наполнителя в композиции будет варьировать в зависимости от активности наполнителя и определенных требований композиции. Как правило, оптимальное количество любого отдельного наполнителя определяют посредством обычного экспериментирования, т.е. с помощью получения композиций, содержащих варьирующие количества наполнителя (в диапазоне от низких до высоких), проверки устойчивости и других параметров и затем определения диапазона, при котором достигается оптимальная эффективность при отсутствии существенных неблагоприятных эффектов.

В целом, однако, наполнитель будет присутствовать в композиции в количестве от приблизительно 1% до приблизительно 99 вес.%, предпочтительно от приблизительно 5% до приблизительно 98 вес.%, более предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 95 вес.% наполнителя, с наиболее предпочтительными концентрациями меньше 30 вес.%.

Эти вышеуказанные фармацевтические наполнители вместе с прочими наполнителями описаны в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), и Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Композиции охватывают все типы составов и, в частности, подходящие для инъекций, например, порошки или лиофилизаты, которые можно восстанавливать, а также жидкости. Примеры подходящих разбавителей для восстановления твердых композиций перед инъекцией включают бактериостатическую воду для инъекций, 5% декстрозу в воде, фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера, физиологический раствор, стерильную воду, деионизированную воду и их комбинации. Что касается жидких фармацевтических композиций, предусматриваются растворы и суспензии.

Композиции одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения, как правило, хотя не обязательно, вводятся путем инъекции и, следовательно, в целом непосредственно перед введением представляют собой жидкие растворы или суспензии. Фармацевтический препарат также может принимать другие формы, такие как сиропы, крема, мази, таблетки, порошки и т.п. Другие способы введения также включаются, такие как легочное, ректальное, трансдермальное, трансмукозальное, пероральное, интратекальное, внутритухоловое, перитуморальное, внутривентральное, подкожное, внутривенное и т.д.

Настоящее изобретение также предусматривает способ введения конъюгата, обеспечиваемого в данном документе, пациенту, страдающему от состояния, что реагирует на лечение с помощью конъюгата. Способ включает введение пациенту, как правило путем инъекции, терапевтически эффективного количества конъюгата (предпочтительно предусматриваемого как часть фармацевтической композиции). Как описано ранее, конъюгаты можно инъецировать (например, внутримышечно, подкожно и парентерально). Подходящие типы составов для парентерального введения, среди прочего, включают растворы, готовые для инъекции, сухие порошки для комбинации с растворителем перед применением, суспензии, готовые для инъекции, сухие нерастворимые композиции для комбинации со средой перед применением и эмульсии и жидкие концентраты для разбавления перед введением.

Способ введения конъюгата (предпочтительно предусматривается как часть фармацевтической композиции) необязательно может проводиться так, чтобы ограничить локализацию конъюгата конкретной областью. Например, жидкие, гелевые и твердые составы, содержащие конъюгат, могут быть хирургически имплантированы в пораженную область (как например, в опухоль, около опухоли, в область воспаления и около области воспаления). Целесообразно, чтобы органы и ткань также можно было визуализировать с целью убеждения в том, что требуемое местоположение лучше подвергается воздействию конъюгата.

Способ введения можно применять для лечения любого состояния, которое можно вылечить или предупредить с помощью введения конъюгата. Специалисты в данной области понимают, какие состояния может эффективно вылечить конкретный конъюгат. Например, конъюгаты могут применяться либо отдельно, либо в комбинации с иной фармакотерапией для лечения пациентов, страдающих от заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака почки, метастатической меланомы, вируса гепатита С (HCV), вируса иммунодефицита человека (HIV), острого миелоидного лейкоза, неходжкинской лимфомы, Т-клеточной лимфомы кожи, ювенильного ревматоидного артрита, атопического дерматита, рака молочной железы и рака мочевого пузыря. Преимущественно, конъюгат можно вводить пациенту перед, одновременно с или после введения другого активного средства.

Фактическая доза, которую следует вводить, будет варьировать в зависимости от возраста, веса и общего состояния субъекта, а также тяжести состояния, подлежащего лечению, решения лечащего врача и конъюгата, подлежащего введению. Терапевтически эффективные количества известны специалистам в данной области техники и/или описаны в текстах ссылок и литературе по данной теме. В целом, терапевтически эффективное количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до 100 мг, предпочтительно в дозах от 0,01 до 75 мг/день и более предпочтительно в дозах от 0,10 до 50 мг/день. Указанная доза может вводиться периодически вплоть до того, например, когда симптомы отравления органофосфатами облегчаться или полностью устраняться.

Единицу дозирования любого указанного конъюгата (в этом случае также предпочтительно предусматриваемого в качестве части фармацевтического препарата) можно вводить в целом ряде режимов дозирования в зависимости от решения клинициста, потребностей пациента и т.д. Конкретный режим дозирования будет известен специалисту в данной области или может определяться экспериментально с применением обычных способов. Иллюстративные режимы дозирования включают, без ограничения, введение один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, два раза в месяц, один раз в месяц и любую их комбинацию. Как только клинический ожидаемый результат достигнут, дозирование композиции прекращают.

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано вместе с его предпочтительными конкретными вариантами осуществления, вышеизложенное описание, а также примеры, которые следуют, предусмотрены для иллюстрирования, а не ограничения объема настоящего изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области, к которой относится настоящее изобретение.

Все статьи, книги, патенты и другие публикации, на которые ссылаются в данном документе, этим включаются посредством ссылки во всей их полноте.

Экспериментальная часть.

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иначе, традиционные методики органического синтеза, биохимии, очистки белка и т.п., которые находятся в компетенции специалиста в данной области. Такие методики в полной мере объясняются в литературе. См., например, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), выше.

В следующих примерах были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температур и т.д.), но следует принимать во внимание некоторую экспериментальную ошибку и отклонение. Если не указано иначе, температура выражается в градусах Цельсия, и давление представляет собой атмосферное давление на уровне моря или примерно таковое. Считается, что каждый из следующих примеров будет полезен специалисту в данной области для выполнения одного или нескольких вариантов осуществления, описанных в данном документе.

Водный раствор ("маточный раствор"), содержащий рекомбинантный IL-2 ("rIL-2"), соответствующий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, при этом последовательность зрелого белка получили от Myoderm (Норристаун, Пенсильвания) для применения в примерах или приготовили в соответствии с примером 1. Концентрация маточного раствора варьировала от 1 до 100 мг/мл.

Анализ SDS-PAGE.

Образцы анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с применением системы Invitrogen NuPAGE и предварительно составленных 4-10% Bis-Tris гелей Novex (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Образцы подготовили, загрузили на гель и осуществили электрофорез, как описано производителем.

Катионообменная хроматография.

Катионообменную колонку SP-HP Sepharose (GE Healthcare) с объемом слоя приблизительно 100 мл подготовили с применением стандартных способов. Колонку присоединили к АКТА Explorer 100 GE Healthcare (Чалфонт Сейнт Джайлс, Великобритания) для очистки приготовленных конъюгатов PEG-rIL-2. Подробности способа очистки описываются ниже.

Анализ RP-HPLC.

Анализ обращенно-фазовой хроматографии (RP-HPLC) проводили на системе HPLC Agilent 1100 (Санта Клара, Калифорния). Образцы анализировали с применением колонки Intrada WP-RP Silverton (Япония) (размер частиц 3 мкм, 2,1×150 мм). Скорость потока колонки составляла 0,5 мл/мин. Подвижные фазы представляли собой 0,09% TFA в воде (растворитель А) и 0,04% TFA в ацетонитриле (растворитель В).

Пример 1. Клонирование гена IL-2 и экспрессия rIL-2.

Последовательность к ДНК человеческого IL-2 может неоптимально экспрессироваться в прокариотах, подобных *E.coli*, из-за значительных различий в частоте использования кодонов различными организмами. Вместо того чтобы производить множество точечных мутаций в существующей последовательности к ДНК происходящей от человека, для максимального увеличения частоты использования кодонов *E.coli*, использовали методику ПЦР для полного синтеза гена.

Способ синтеза гена из перекрывающихся праймеров по сути представлял собой комбинацию двух способов с минимальными модификациями. Основное обсуждение каждого отдельного способа представлено в Young et al. (2004) *Nucleic Acids Research* 32(7):e59, и Devlin et al. (1988) *Gene* 65:13-22. Вкратце, последовательность ДНК разделили на прямые и обратные олигонуклеотиды меньше 35 п.о. с несколькими исключениями и между олигонуклеотидами не было гэпов. Каждый олигонуклеотид перекрывался с двумя смежными олигонуклеотидами на противоположной нити со стороны 3'-концов по меньшей мере на 10 нуклеотидов и со стороны 5'-концов по меньшей мере на 15 нуклеотидов. Двойную асимметричную ПЦР применяли для сборки субфрагментов гена и для сборки целого гена их объединяли с применением перекрывающейся ПЦР. Затем применили этап отбора с помощью T7 эндонуклеазы I для удаления несоответствующих двойных спиралей, как описывается у Young et al. См. Young et al. (2004) *Nucleic Acids Research* 32(7):e59. Сайты для рестриционных ферментов включили в концевые элементы гена и конечный генный компонент клонировали в коммерчески доступный вектор экспрессии для *E.coli*. Секвенирование ДНК применили для подтверждения полученной последовательности, показанной на фиг. 1 и SEQ ID NO: 5.

При применении этого подхода, как показано, аминокислотная последовательность не включает аминокислотное положение #1 (аланин) по сравнению с нативной зрелой человеческой последовательностью.

стью и включает аминокислотную мутацию С → S в аминокислотном положении #125 касательно последовательности. Первая аминокислота в этой последовательности представляет собой метионин для прямой бактериальной экспрессии (не кодируется сигнальный пептид). После экспрессии, однако, начальный метионин удаляется с помощью метионин-аминопептидазы хозяина.

Ген клонировали в один из векторов экспрессии рЕТ (Т7). Белок экспрессировался в штамме BL21(DE3) *E.coli*, одном из штаммов, как правило, применяемых для экспрессионной системы Т7. Эта экспрессионная система доступна коммерчески и способы для экспрессии доступны от EMD Biosciences, Merck KGaA, Дармштадт, Германия. Применение этой системы проводили на основании разрешения на исследование от Brookhaven National Laboratory. Вектор обусловил экспрессию белка в виде телец-включений в *E.coli*. Типичные предписания, применяемые для экспрессии, можно найти в литературе и в Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures, F. William Studier, Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973 (December 20, 2007).

После ферментации клетки собирали центрифугированием. Осадок клеточной массы хранили при -80°C для гомогенизации в будущем. Замороженный осадок клеточной массы ресуспендировали в буфере для отмывки клеток (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0) до концентрации 10% (вес./об.) и центрифугировали при 13860×g в течение 30 мин. Супернатант отбросили. Промытый осадок ресуспендировали в буфере для гомогенизации (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8,0) и гомогенизировали с помощью Microfluidizer (M-110P от Microfluidics, Ньютон, Массачусетс, США) при 4-15°C за один проход. Гомогенат развели в 2 раза с применением буфера для отмывки клеток (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0) и центрифугировали при 13860×g в течение 60 мин. Супернатант отбросили. Осадок телец-включений трижды промыли с последовательным применением буферов 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 2% Triton X-100, pH 8,0; 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% деоксихолат натрия, pH 8,0, и 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1M NaCl, pH 8,0. После промывки получили неочищенные тельца-включения IL-2.

Неочищенные тельца-включения IL-2 растворили в буфере с 6M гуанидина, 100 mM Tris, pH 8. Добавили EDTA до конечной концентрации 2 mM. Затем добавили дитиотреитол (DTT) до конечной концентрации 50 mM. Смесь инкубировали при 50°C в течение 30 мин. После восстановления для снижения концентрации гуанидина до 4,8 к смеси добавили воду. После центрифугирования в течение одного часа при 13860×g образующийся в результате гелеобразный осадок отбросили. Концентрацию гуанидина в супернатанте дополнительно снизили до 3,5M с помощью добавления воды. pH довели до 5 посредством титрации 100% уксусной кислотой. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин и центрифугировали при 13860×g в течение одного часа. Образующийся осадок суспендировали в буфере с 3,5M гуанидина, 20 mM ацетата, 5 mM DTT, pH 5, и центрифугировали при 13860×g в течение одного часа. Этот этап отмывки повторили еще раз.

Чистые и восстановленные тельца-включения IL-2 растворили в буфере с 6M гуанидина, 100 mM Tris, pH 8. Добавили маточный раствор 100 mM  $\text{CuCl}_2$  для достижения конечной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  0,1 mM. Смесь инкубировали при 4°C в течение ночи.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения направлен на усовершенствованный способ обеспечения возможности белкам получить третичную структуру. В этом отношении предыдущие способы часто зависели от ступенчатого разведения, которое часто было агрессивным в отношении белков. Таким образом, в усовершенствованном подходе обеспечения возможности фолдинга белков при более щадящих условиях предусматривается способ, где способ включает этап помещения экспрессированного белка (например, компонента IL-2, такого как IL-2, полученного в соответствии с этим примером) внутрь диализного мешка с меньшим размером пор от размера экспрессированного белка и добавления (предпочтительно на протяжении нескольких часов, например, на протяжении 6 ч, более предпочтительно на протяжении 10 ч и еще более предпочтительно на протяжении 15 ч) раствора, не содержащего средств, денатурирующих белок (например, воду). Иллюстративные растворы, не содержащие средств, денатурирующих белок, известны специалистам в данной области и включают, например, растворы (например, буферы и воду), которые не содержат (или по существу не содержат) гуанидин, мочевины, перхлорат лития, 2-меркаптоэтанол, дитиотреитол и детергенты. Таким образом, в соответствии с этим способом раствор экспрессированного IL-2 поместили в диализные мешки (с размером пор для молекулярной массы 3,5 кДа). Диализные мешки поместили в емкость, содержащую буфер с 4,8M гуанидина, 0,1M Tris, pH 8. После трех часов уравнивания концентрацию гуанидина в емкости медленно снизили до 2M с помощью подачи воды в емкость за период 15 ч. Весь процесс рефолдинга совершался при 4°C. IL-2 после рефолдинга проверяли посредством SEC-HPLC.

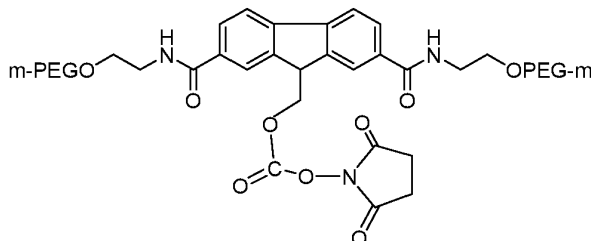
IL-2 после рефолдинга центрифугировали при 13860×g в течение 60 мин для удаления осадков. Супернатант концентрировали с помощью мембранной системы Pellicon XL TFF (Millipore Corporation, США).

IL-2 после рефолдинга и концентрирования загрузили на колонку BPG (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Уппсала, Швеция), заполненную смолой Sephacryl S-100 HR. Подвижный буфер представлял собой 2 M гуанидин, 20 mM Tris, pH 8, и скорость потока составляла 25 мл/мин. Фракции, соответствующие пику мономера IL-2, объединяли. Следует отметить, что также можно использовать другие подходящие спо-

собы очистки, такие как ионообменная хроматография и хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC-хроматография).

Совокупность фракций мономера IL-2 концентрировали до приблизительно 1-2 мг/мл с применением мембранной системы Pellicon XL TFF (Millipore Corporation, США) при 4°C и рабочем давлении 30-40 psi. Концентрированный раствор мономера IL-2 подвергали диализу в буфере конечного состава (10 mM ацетат-Na, 5% трегалоза, pH 4,5), чтобы снизить концентрацию гуанидина ниже 0,1 mM посредством смены буфера состава несколько раз (в норме 4-5 раз). Составленный раствор IL-2 простерилизовали с помощью пропускания через 0,22 мкм фильтр и хранили при -80°C для дальнейшего применения.

Пример 2. ПЭГилирование rIL-2 с помощью mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS



mPEG<sub>2</sub>-C2-fmoc-20K-N-гидроксисукцинимидное производное, 20 кДа, ("mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS")

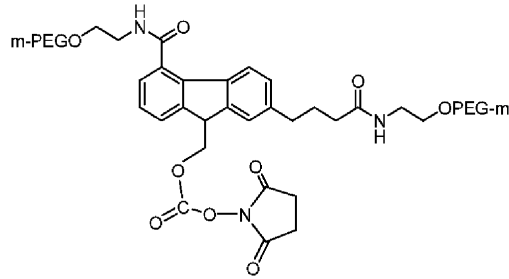
Нагрели mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS, который хранили при -80°C под аргоном, до температуры внешней среды с продувкой азотом. Маточный раствор (200 мг/мл) mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS приготовили в 2 mM HCl и mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS добавили к rIL-2 в количестве, достаточном для достижения молярного соотношения mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS к rIL-2 100:1. Конечная концентрация rIL-2 в смеси составила 0,5 мг/мл (0,035 mM). В смесь добавили буферный раствор бикарбоната натрия (1M, pH 9,0) с достижением конечной концентрации 20 mM и обеспечили возможность протекания конъюгации в течение тридцати минут для образования конъюгатов [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2]. По истечении тридцати минут обеспечили остановку реакции посредством добавления к реакционной смеси 1M глицина (pH 6,0) с достижением конечной концентрации 100 mM. Следующим шагом после остановки реакции реакционную смесь развели H<sub>2</sub>O с обеспечением электропроводности ниже 0,5 мСм/см (25°C). Довели pH до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты перед очисткой с применением колоночной хроматографии.

Типичный профиль очистки катионообменной хроматографией [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] представлен на фиг. 2.1. Указаны [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] и непрореагировавший PEG, и линии соответствуют поглощению при разных длинах волн (например, 280 и 225 нм). С помощью анализа чистоты [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] путем анализа обращенно-фазовой HPLC обнаружили 100% чистоту очищенного конъюгата при 280 нм. См. фиг. 2.2. Чистота составляла не менее 95%, как определили с помощью 4-12% Bis-Tris геля SDS-PAGE NuPage при окрашивании кумасси голубым (гель не показан) при использовании 20 мкг очищенного [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2].

Наблюдаемая большая молекулярная масса конъюгата, выше 200 кДа, как предполагали, являлась результатом медленного перемещения конъюгата через гель из-за высокой степени гидратации PEG, и приводящей в результате к относительно большому гидродинамическому радиусу. При помощи этих тестов было подтверждено, что образовались три конъюгата: 4-mer, 3-mer, 2-mer и 1-mer, т.е. [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2], в котором четыре "[mPEG2-C2-fmoc-20K]" прикреплены к одному "[rIL-2]" касательно 4-mer, три "[mPEG2-C2-fmoc-20K]" прикреплены к одному "[rIL-2]" касательно 3-mer, два "[mPEG2-C2-fmoc-20K]" прикреплены к одному [rIL-2] касательно 2-mer и один "[mPEG2-C2-fmoc-20K]" прикреплен к одному [rIL-2] касательно 1-mer.

Свойство подвержения разрыву [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] с выделением rIL-2 показано с помощью обнаружения изменения видов с помощью обращенно-фазовой HPLC. Вкратце, очищенный [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] инкубировали в 100 mM растворе NaHCO<sub>3</sub> при pH 9,0, 37°C, в течение нескольких часов. Периодически отбирали аликвоты системы и тестировали для обнаружения исчезновения конъюгата [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] и присутствия освобожденного rIL-2. Отмечали выход на плато rIL-2 около десяти часов после инкубации с постепенным снижением, возможно, из-за осаждения. Данные представлены на фиг. 2.3.

Пример 3. ПЭГилирование rIL-2 посредством mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS

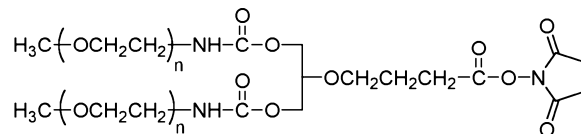


mPEG2-CAC-fmoc-20K-N-гидроксисукцинимидное производное, 20 кДа, ("mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS").

Нагрели mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS, который хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  под аргоном, до температуры внешней среды с продувкой азотом. Маточный раствор (200 мг/мл) mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS приготовили в 2 мМ HCl и добавили mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS к rIL-2 в количестве, достаточном для достижения молярного соотношения mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS к rIL-2 100:1. Конечная концентрация rIL-2 в смеси составила 0,5 мг/мл (0,035 мМ). В смесь добавили буферный раствор бикарбоната натрия (1М, pH 9,0) с достижением конечной концентрации 20 мМ и обеспечили возможность протекания конъюгации в течение тридцати минут для образования конъюгатов [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]. По истечении тридцати минут обеспечили остановку реакции посредством добавления к реакционной смеси 1М глицина (pH 6,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ. Следующим шагом после остановки реакции реакционную смесь развели  $\text{H}_2\text{O}$  с обеспечением электропроводности ниже 0,5 мСм/см ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Довели pH до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты перед очисткой с применением колоночной хроматографии.

Типичный профиль очистки катионообменной хроматографией [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] представлен на фиг. 3.1. Указан [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], и линии соответствуют поглощению при разных длинах волн. С помощью анализа чистоты [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] путем анализа обращенно-фазовой HPLC обнаружили 98,5% чистоту очищенного конъюгата при 280 нм. Пик в 19,6 мин представляет непрореагировавший mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS (который составил <0,1%). См. фиг. 3.2. Чистота составляла не менее 95%, как определили с помощью 4-12% Bis-Tris геля SDS-PAGE Nu-Page при окрашивании кумасси голубым (гель не показан) при использовании 20 мкг очищенного [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]. Наблюдаемая большая молекулярная масса конъюгата, выше 200 кДа, как предполагалось, являлась результатом медленного перемещения конъюгата через гель из-за высокой степени гидратации PEG. Молекулярную массу очищенных конъюгатов [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] также определили с помощью спектрофотометрии MALDI-TOF. Как видно на фиг. 3.3, главный пик с 79,6 кДа находится в пределах ожидаемого диапазона для молекулярной массы конъюгата 3-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]. Пик 100,8 кДа находится в пределах ожидаемого диапазона молекулярной массы 4-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]. Пики с MW 40 и 58,7 кДа могут представлять двухзрядный конъюгат 3-мер IL-2 и конъюгаты 4-мер IL-2.

Пример 4. ПЭГиление rIL-2 с помощью разветвленного mPEG-N-гидроксисукцинимидильного производного, 20 кДа



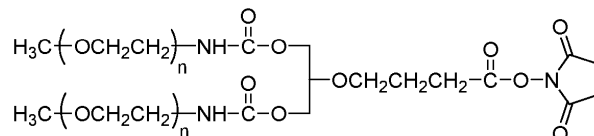
mPEG2-gu-20K-N-гидроксисукцинимидильное производное, 20 кДа, ("mPEG2-gu-20K-NHS").

Нагрели mPEG2-gu-20K-NHS, который хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  под аргоном, до температуры внешней среды с продувкой азотом. Маточный раствор (200 мг/мл) mPEG2-gu-20K-NHS приготовили в 2 мМ HCl и добавили mPEG2-gu-20K-NHS к rIL-2 в количестве, достаточном для достижения молярного соотношения mPEG2-gu-20K-NHS к rIL-2 100:1. Конечная концентрация rIL-2 в смеси составила 0,5 мг/мл (0,035 мМ). В смесь добавили буферный раствор бикарбоната натрия (1М, pH 9,0) с достижением конечной концентрации 20 мМ и обеспечили возможность протекания конъюгации в течение тридцати минут для образования конъюгатов [mPEG2-gu-20K]-[rIL-2]. По истечении тридцати минут обеспечили остановку реакции посредством добавления к реакционной смеси 1М глицина (pH 6,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ. Следующим шагом после остановки реакции реакционную смесь развели  $\text{H}_2\text{O}$  с обеспечением электропроводности ниже 0,5 мСм/см ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Довели pH до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты перед очисткой с применением колоночной хроматографии.

Типичный профиль очистки катионообменной хроматографией [mPEG2-gu-20K]-[rIL-2] представлен на фиг. 4.1. Указаны [mPEG2-gu-20K]-[rIL-2] и непрореагировавший mPEG2-gu-20K-NHS, и линии соответствуют поглощению при разных длинах волн (например, 280 и 225 нм). С помощью анализа чистоты [mPEG2-gu-20K]-[rIL-2] путем анализа обращенно-фазовой HPLC обнаружили 100% чистоту очи-

шенного конъюгата при 280 нм. См. фиг. 4.2. Чистота составляла не менее 95%, как определили с помощью 4-12% Bis-Tris геля SDS-PAGE NuPage при окрашивании кумасси голубым (гель не показан) при использовании 20 мкг очищенного [mPEG2-gu-20K]-[rIL-2]. Наблюдаемая большая молекулярная масса конъюгата, выше 200 кДа, была результатом медленного перемещения конъюгата через гель из-за высокой степени гидратации PEG.

Пример 5. ПЭГилирование rIL-2 с помощью разветвленного mPEG-N-гидроксисукцинимидильного производного, 40 кДа

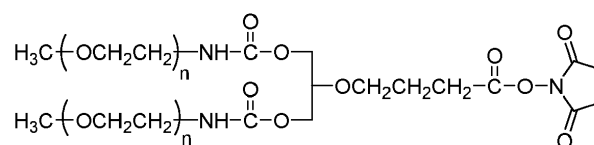


mPEG2-gu-40K-N-гидроксисукцинимидильное производное, 40 кДа ("mPEG2-gu-40K-NHS").

Нагрели mPEG2-gu-40K-NHS, который хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  под аргоном, до температуры внешней среды с продувкой азотом. Маточный раствор (200 мг/мл) mPEG2-gu-40K-NHS приготовили в 2 мМ HCl и mPEG2-gu-40K-NHS и добавили к rIL-2 в количестве, достаточном для достижения молярного соотношения mPEG2-gu-40K-NHS к rIL-2 100:1. Конечная концентрация rIL-2 в смеси составила 0,5 мг/мл (0,035 мМ). В смесь добавили буферный раствор бикарбоната натрия (1М, pH 9,0) с достижением конечной концентрации 20 мМ и обеспечили возможность протекания конъюгации в течение тридцати минут для образования конъюгатов [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2]. По истечении тридцати минут обеспечили остановку реакции посредством добавления к реакционной смеси 1М глицина (pH 4,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ. Следующим шагом после остановки реакции реакционную смесь развели  $\text{H}_2\text{O}$  с обеспечением электропроводности ниже 0,5 мСм/см ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Довели pH до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты перед очисткой с применением колоночной хроматографии.

Типичный профиль очистки катионообменной хроматографией [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2] представлен на фиг. 5. Указаны [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2] и непрореагировавший PEG, и линии соответствуют поглощению при 280 нм. С помощью анализа чистоты [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2] путем анализа обращенно-фазовой HPLC обнаружили 100% чистоту очищенного конъюгата при 280 нм. Чистота составляла не менее 95%, как определили с помощью 4-12% Bis-Tris геля SDS-PAGE NuPage при окрашивании кумасси голубым (гель не показан) при использовании 20 мкг очищенного [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2]. Наблюдаемая большая молекулярная масса конъюгата (вероятно вида 3-мер [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2]), выше 200 кДа, была результатом медленного перемещения конъюгата через гель из-за высокой степени гидратации PEG. Сперва через колонку элюировался непрореагировавший mPEG2-gu-40K-NHS, за ним следовали конъюгаты [mPEG2-gu-40K]-[rIL-2].

Пример 6. ПЭГилирование rIL-2 с помощью разветвленного mPEG-N-гидроксисукцинимидильного производного, 4 кДа

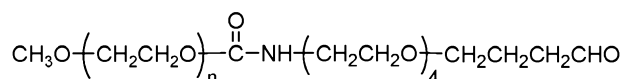


mPEG2-gu-20K-N-гидроксисукцинимидильное производное, 4 кДа, ("mPEG2-gu-4K-NHS").

Нагрели mPEG2-gu-4K-NHS, который хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  под аргоном, до температуры внешней среды с продувкой азотом. Маточный раствор (200 мг/мл) mPEG2-gu-4K-NHS приготовили в 2 мМ HCl и mPEG2-gu-4K-NHS добавили к rIL-2 в количестве, достаточном для достижения молярного соотношения mPEG2-gu-4K-NHS к rIL-2 100:1. Конечная концентрация rIL-2 в смеси составила 0,5 мг/мл (0,035 мМ), солюбилизированного с помощью 0,015% SDS. В смесь добавили буферный раствор бикарбоната натрия (1М, pH 9,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ и обеспечили возможность протекания конъюгации в течение тридцати минут для образования конъюгатов [mPEG2-gu-4K]-[rIL-2]. По истечении тридцати минут обеспечили остановку реакции посредством добавления к реакционной смеси 1М глицина (pH 4,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ. Следующим шагом после остановки реакции реакционную смесь развели  $\text{H}_2\text{O}$  с обеспечением электропроводности ниже 0,5 мСм/см ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Довели pH до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты перед очисткой с применением колоночной хроматографии.

Типичный профиль очистки катионообменной хроматографией [mPEG2-gu-4K]-[rIL-2] представлен на фиг. 6. Элюированные конъюгаты [mPEG2-gu-4K]-[rIL-2] показали смесь из конъюгатов 3-мер, 2-мер и 1-мер [mPEG2-gu-4K]-[rIL-2] во фракциях элюирования. Фракции, содержащие смесь 3-/2-мер [mPEG2-gu-4K]-[rIL2], а также фракции, содержащие смесь 2-/1-мер [mPEG2-gu-4K]-[rIL2], объединили отдельно, как показано на фиг. 6.

Пример 7. ПЭГилирование rIL-2 с помощью линейного mPEG-бутиральдегидного производного, 30 кДа



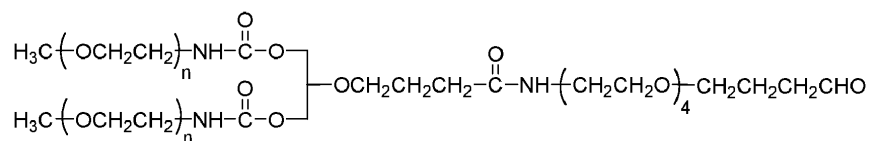
Линейное mPEG-бутиральдегидное производное, 30 кДа ("mPEG-ButyrALD").

Реакции ПЭГилирования разработали таким образом, чтобы после добавления всех ингредиентов и буферов реакции конечная концентрация rIL-2 составила 2,5 мг/мл. mPEG-ButyrALD, 30 кДа, который хранили при -20°C под аргоном, нагрели до температуры внешней среды. Количество реагента PEG, равное 10-50 моль эквивалентов rIL-2, подлежащего ПЭГилированию, взвесили и растворили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) и 1 мМ EDTA с образованием 12% раствора реагента. 12% раствор реагента PEG добавили к аликвоте маточного раствора rIL-2 и перемешивали в течение 15-30 мин. Затем добавили восстанавливающее средство, цианоборгидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>), в 10-100 молярном избытке относительно реагента PEG и реакцию перемешивали в течение 5-18 ч при комнатной температуре, чтобы удостовериться в соединении путем связи через вторичный амин с образованием, таким образом, раствора конъюгата.

Обнаружили, что альдегидная группа mPEG-ButyrALD реагирует с первичными аминами, ассоциированными с rIL-2, и ковалентно связывается с ним через вторичный амин после восстановления с помощью восстанавливающего реагента, такого как цианоборгидрид натрия. Селективность в отношении того, какой амин(ы) прикрепляется к полимеру, можно модулировать с помощью регулирования рН условий конъюгации. Условия с относительно низким рН (например, около рН 5,5) будут направлять конъюгацию к N-концу. При условиях с относительно нейтральным рН (например, около 7,5 и немного выше) ковалентное прикрепление становится более частым в других положениях (т.е. при аминах боковых цепей лизиновых остатков, содержащихся в пределах белка). Регуляция рН условий конъюгации будет обеспечивать некоторую степень контроля в отношении того, в каких положениях будет происходить конъюгация, таким образом, добиваясь лучшей возможности получать требуемые позиционные изомеры.

С применением того же самого подхода получили другие конъюгаты, применяя mPEG-ButyrALD с другими средневесовыми молекулярными массами.

Пример 8. ПЭГилирование rIL-2 с помощью разветвленного mPEG-бутиральдегидного производного, 40 кДа



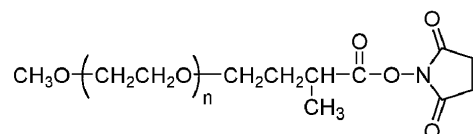
Разветвленное mPEG-бутиральдегидное производное, 40 кДа ("mPEG2-ButyrALD").

Реакции ПЭГилирования разработали таким образом, чтобы после добавления всех ингредиентов и буферов реакции конечная концентрация rIL-2 составила 2,5 мг/мл. mPEG2-ButyrALD, 40 кДа, который хранили при -20°C под аргоном, нагрели до температуры внешней среды. Количество реагента PEG, равное 10-50 моль эквивалентов rIL-2, подлежащего ПЭГилированию, взвесили и растворили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) и 1 мМ EDTA с образованием 12% раствора реагента. 12% раствор реагента PEG добавили к аликвоте маточного раствора rIL-2 и перемешивали в течение 15-30 мин. Затем добавили восстанавливающее средство, цианоборгидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>), в 10-100 молярном избытке относительно реагента PEG и реакцию перемешивали в течение 5-18 ч при комнатной температуре, чтобы удостовериться в соединении путем связи через вторичный амин с образованием, таким образом, раствора конъюгата.

Обнаружили, что альдегидная группа mPEG2-ButyrALD реагирует с первичными аминами, ассоциированными с rIL-2, и ковалентно связывается с ними через вторичный амин после восстановления с помощью восстанавливающего реагента, такого как цианоборгидрид натрия.

С применением того же самого подхода получили другие конъюгаты, применяя mPEG-ButyrALD с другими средневесовыми молекулярными массами.

Пример 9. ПЭГилирование rIL-2 с помощью линейного mPEG-сукцинимидильного α-метилбутаноатного производного, 30 кДа



Линейное mPEG-сукцинимидильное α-метилбутаноатное производное, 30 кДа ("mPEG-SMB").

Реакции ПЭГилирования разработали таким образом, чтобы после добавления всех ингредиентов и буферов реакции конечная концентрация rIL-2 составила 2,5 мг/мл. mPEG-SMB, 30 кДа, который хранили при -20°C под аргоном, нагрели до температуры внешней среды. Количество реагента PEG, равное 10-50 моль эквивалентов rIL-2, подлежащего ПЭГилированию, взвесили и растворили в 20 мМ натрий-



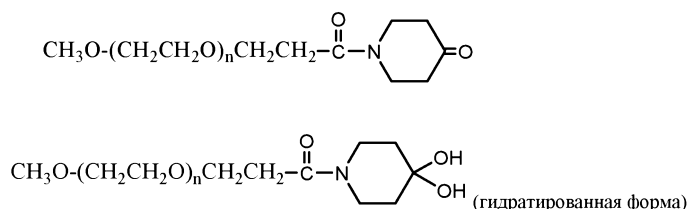
фосфатном буфере (рН 7,5) и 1 мМ EDTA с образованием 12% раствора реагента. 12% раствор реагента PEG добавили к аликвоте маточного раствора rIL-2 и перемешивали в течение 5-18 ч при комнатной температуре, таким образом, получая в результате раствор конъюгата. Реакцию раствора конъюгата остановили с помощью раствора лизина (рН 7,5) так, чтобы конечная молярная концентрация лизина составила 10-100-кратную молярную концентрацию реагента PEG.

Обнаружили, что производное mPEG-SMB обеспечивает стерически затрудненный активный сложный эфир NHS, который селективно реагирует с лизином и концевыми аминами.

С применением того же самого подхода получили другие конъюгаты, применяя mPEG-SMB с другими средневесовыми молекулярными массами.

Пример 10. ПЭГилирование rIL-2 с помощью mPEG-PIP, 20 кДа.

Основная структура полимерного реагента приведена ниже:



Реакции ПЭГилирования разработали таким образом, чтобы после добавления всех ингредиентов и буферов реакции конечная концентрация rIL-2 составила 2,5 мг/мл. mPEG-PIP, 20 кДа, который хранили при -20°C под аргоном, нагрели до температуры внешней среды. Количество реагента PEG, равное 10-50 моль эквивалентов rIL-2, подлежащего ПЭГилированию, взвесили и растворили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) и 1 мМ EDTA с образованием 12% раствора реагента. 12% раствор реагента PEG добавили к аликвоте маточного раствора rIL-2 и перемешивали в течение 15-30 мин. Затем добавили восстанавливающее средство, цианоборгидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>), в 10-100 молярном избытке относительно реагента PEG и реакцию перемешивали в течение 5-18 ч при комнатной температуре, чтобы удостовериться в соединении путем связи через вторичный амин (с вторичным углеродом) с образованием, таким образом, раствора конъюгата. Реакцию раствора конъюгата остановили с помощью раствора лизина (рН 7,5) так, чтобы конечная молярная концентрация лизина составила 10-100-кратную молярную концентрацию реагента PEG.

Обнаружили, что кетонная группа mPEG-PIP реагирует с первичными аминами, ассоциированными с rIL-2, и ковалентно связывается с ними через вторичный амин после восстановления с помощью восстанавливающего реагента, такого как цианоборгидрид натрия.

С применением того же самого подхода получали другие конъюгаты, применяя mPEG-PIP с другими средневесовыми молекулярными массами.

Пример 11. Активность иллюстративных конъюгатов (rIL-2)-PEG.

Оценили активность альдеслейкина (контроль), [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 2, [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 3 и [mPEG2-tu-20K]-[rIL-2] из примера 4 в анализе клеточной пролиферации с применением клеток CTLL-2.

Клетки CTLL-2 (клеточная линия цитотоксических Т-лимфоцитов мыши) поддерживали в полной среде RPMI 1640, дополненной 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 10% фетальной бычьей сывороткой и 10% культуральной добавкой для IL-2 (T-STIM™ с CоpA (конканавалин-A)), при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Эти клетки культивировали в суспензии, пока они не достигли плотности клеток 2-3×10<sup>5</sup> клеток/мл перед разделением.

Для анализа на активность на 3-4 день после последнего деления клетки трижды промыли в фосфатно-солевом буфере Дульбекко. Затем клетки ресуспендировали в дополненной среде без T-STIM™ при плотности клеток ~2×10<sup>5</sup> клеток/мл и выселили на 96-луночные микропланшеты с белыми стенками и прозрачным дном при 90 мкл/лунку. Эксперименты также проводили с применением дополненной среды (без T-STIM™), доведенной до рН 6,7-7, чтобы свести к минимуму разрыв конъюгатов во время инкубации. Затем добавили 10 мкл 10-кратной концентрации тестируемого соединения, разведенного в дополненной среде без T-STIM™. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. После 24 ч инкубации в каждую лунку добавили по 100 мкл реагента CellTiter-Glo® от Promega. Содержимое планшетов перемешивали в течение двух минут на орбитальном встряхивателе, затем инкубировали при комнатной температуре в течение десяти минут. Следующим шагом регистрировали люминесценцию с помощью прибора TopCount® от Perkin Elmer при времени интеграции одна секунда/лунка.

Касательно поддающихся разрыву конъюгатов [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 2 и поддающихся разрыву конъюгатов [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 3 тестировали активность конъюгатов как с высвобожденным IL-2, так и невысвобожденным. Тестируемые соединения хранили при кислых условиях (10 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 4) для стабилизации конъюгации. Для тестирования активности конъюгатов образец из буфера для хранения развели в дополненной среде ~ за один час

до анализа. Для тестирования активности высвобожденного IL-2 поддающиеся разрыву конъюгаты {т.е. конъюгаты [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 2 и конъюгаты [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 3} десятикратно развели в 100 мМ (конечная концентрация) буфере бикарбоната натрия, pH 9, и предварительно инкубировали при 37°C в течение восьми часов перед началом анализа.

Значения EC<sub>50</sub> (концентрация тестируемого соединения, требуемая для проявления 50% максимального ответа) для клеточной пролиферации получили из анализа нелинейной регрессии кривых зависимости доза-эффект с применением программного обеспечения Prism 5.01 от GraphPad.

Активности альдеслейкина и конъюгатов измеряли с применением анализа клеточной пролиферации, и обобщение результатов показано в табл. 4. Все тестируемые продукты индуцировали рост клеток CTLL-2 дозозависимым образом. Поскольку поддающиеся разрыву конъюгаты предварительно инкубировали при условиях для усиления высвобождения белка, альдеслейкин также предварительно инкубировали в качестве контроля, чтобы протестировать в отношении устойчивости белка самого по себе в условиях обработки, усиливающей высвобождение. Как показано в табл. 4, альдеслейкин оставался устойчивым после предварительной инкубации при условиях высвобождения (8 ч при 37°C, pH 9) и проявлял сравнимую эффективность с альдеслейкином, который хранили при рекомендованных условиях. После предварительной инкубации [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 2 и [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 3 при условиях с индуцированием высвобождения IL-2, активность восстанавливалась, как показано на фиг. 8; IL-2, высвобожденный из этих конъюгатов, проявлял сравнимую эффективность с контрольным альдеслейкином, тогда как некоторые неразорванные конъюгаты были менее эффективны в сравнении с альдеслейкином. Устойчивые конъюгаты 3-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] проявляли наименьшую эффективность (фиг. 7) и составляли 0,04% по сравнению с альдеслейкином, но 1-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] показал эквивалентную альдеслейкину эффективность, принимая во внимание известное стандартное отклонение анализа.

Таблица 4. Краткое описание клеточной пролиферации CTLL-2 в ответ на альдеслейкин и конъюгаты PEG-IL-2

Тестируемое соединение	EC50 (нг/мл)	Эффективность относительно альдеслейкина (%)
альдеслейкин	0,111	102
альдеслейкин (контроль высвобождения)	0,113	100
3-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] (поданный условиям высвобождения)	0,076	149
1-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] (поданный условиям высвобождения)	0,105	108
3-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] (поданный условиям высвобождения)	0,246	46
1-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] (поданный условиям высвобождения)	0,056	202
3-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] (не поданный условиям высвобождения)	0,497	23
1-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] (не поданный условиям высвобождения)	0,074	153
3-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] (не поданный условиям высвобождения)	5,163	2
1-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] (не поданный условиям высвобождения)	0,143	79
3-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2]	194,400	0,04
1-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2]	0,168	67

Пример 12. Фармакокинетика иллюстративных конъюгатов (rIL-2)-PEG.

Фармакокинетические профили альдеслейкина (контроль), [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 2, [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] из примера 3 и [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] из примера 4 оценивали в ELISA после однократной инъекции у мышей.

Концентрации альдеслейкина измерили с помощью гетерогенного "сэндвич" ELISA. Вкратце, 96-луночные титрационные микропланшеты покрыли с помощью мышинового моноклонального антитела к IL-2 и блокировали. Образцы и стандарты приготовили в чистой плазме и затем разбавили до 10% плазмы с помощью буфера, содержащего биотинилированные поликлональные антитела кролика к IL-2, перед тем как инкубировать на планшетах для анализа. Для выявления IL-2 применяли стрептавидинпероксидазу хрена с последующим добавлением субстрата для колориметрии, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ). Добавили стоп-раствор и считывали поглощение при 450 нм с вычитанием фона при 650 нм. Стандартную кривую составляли с помощью взвешенного 4-параметрического алгоритма и определяли концентрации образцов с помощью интерполяции относительно стандартной кривой. Нижняя

граница количественного определения составила 0,05 нг/мл.

Концентрации объединенных 1-мер/2-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] измерили с помощью гомогенного анализа HTRF® (Cisbio US, Бэдфорд, Массачусетс). Реакционную смесь (15 мкл, конъюгированное с хроматом европия моноклональное антитело мыши к IL-2, стрептавидин-d2, и биотинилированное моноклональное антитело кролика к PEG) внесли в белые, малого объема, 384-луночные титрационные микропланшеты. Добавили образцы и стандарты (5 мкл), разбавленные в чистой плазме, и планшеты инкубировали. Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при 615 и 665 нм и рассчитывали показатель Delta F. Стандартную кривую построили с помощью взвешенного 5-параметрического алгоритма и определили концентрации образцов с помощью интерполяции относительно стандартной кривой. Нижняя граница количественного определения составила 0,05 нг/мл.

В анализе общего IL-2 измерили 3-мер [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] и 3-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]. Поскольку конъюгаты [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] и [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] представляют собой поддающиеся разрыву конъюгаты, в образце будут присутствовать различные виды молекул, делая отдельное количественное определение сложным; следовательно, измеряли общие уровни IL-2. Полимерсодержащий компонент конъюгатов заставляли высвободиться из конъюгатов с помощью разбавления образцов и стандартного маточного раствора, приготовленного в чистой плазме, 1:1 с помощью буфера для высвобождения (100 мМ HEPES/100 мМ Tris-HCL, pH 9) и инкубирования при 37°C в течение 30-36 ч. После инкубации добавили 25 об.% 0,1М уксусной кислоты для нейтрализации высокого pH. Высвобожденный IL-2 измерили с помощью ELISA, описанного выше.

На фиг. 9а показан график концентрация-время протестированных продуктов у мышей C57BL/6 после однократной внутримышечной инъекции (1 мг/кг). Образцы плазмы с гепарином натрия собирали в 10 мин и в 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168 и 336 ч. Геометрические средние концентраций рассчитывали от 3 мышей на момент времени. Как показано на фиг. 9, альдеслейкин обладал короткой  $1/2$ -жизнью и не обнаруживался после 6 ч (<0,05 нг/мл), в то время как конъюгаты обладали продолженной  $1/2$ -жизнью и все еще обнаруживались через 336 ч.

Пример 13. Исследования эффективности в отношении метастатической меланомы легкого.

Для оценки эффективности соединений с предполагаемой активностью IL-2 широко применяли модель метастатической меланомы легкого и ее разработали на мышях C57BL/6. В этой модели мышам сперва внутривенно ввели клетки меланомы B16F10, которые вызывают развитие различного числа узлов в легких и различных размеров. Число узлов в легких, а также общая площадь поверхности этих поражений варьирует в зависимости от концентрации имплантируемых клеток. Затем тестируемое соединение, представляющее интерес, ввели группе мышей, подлежащей обработке, а другую группу мышей оставили необработанной, чтобы она служила в качестве контроля. Эффективность тестируемого соединения можно определять как процент уменьшения числа и размера узлов в легких, а также общей площади поражения для каждого легкого между обработанной и необработанной группами.

В этом исследовании 100000 клеток B16F10 (пассаж, не превышающий P8) имплантировали посредством инъекций в хвостовую вену. На третий день от даты имплантации клеток ввели тестируемые соединения, представляющие интерес (или среду), как указано в табл. 5, в результате либо IP (внутрибрюшинного), либо IV (внутривенного) пути введения.

Таблица 5. Распределение групп для примера 13

№ группы	Тестируемый продукт	Клетки B16F10	Путь введения	№ животного	Доза
A	Альдеслейкин (Prometheus Laboratories Inc.)	100000	IP	1-12	b.i.d x5
B	Компонент IL-2 из примера 1	100000	IP	1-12	b.i.d x5
C	Среда	100000	IP	1-12	b.i.d x5
D	NKT-11135-A-001	100000	IV	1-12	q2dx3
E	Объединенные 3-мер/4-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]	100000	IV	1-12	q2dx3
F	Объединенные 1-мер/2-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2]	100000	IV	1-12	q2dx3
G	Объединенные 3-мер/4-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2]	100000	IV	1-12	q2dx3

Примечание: "b.i.d x 5" означает дважды в день в течение пяти дней; "q2d x 3" означает каждый второй день в рамках 3 доз.

На 14-й день после дня имплантации клеток мышей забили, при этом выделили и зафиксировали легкие в растворе Буэна, содержащем формальдегид, на день или два. Легкие (которые зафиксировали в растворе Буэна) просмотрели под стереоскопическим микроскопом и определили число и размер поражений для каждого легкого.

Как показано на фиг. 10, на 14-й день после дня имплантации клеток мышей забили и их выделенные легкие зафиксировали в растворе Буэна. Опухолевые узлы и их размеры подсчитали для каждого из альдеслейкина (Prometheus Laboratories Inc., Сан-Диего, Калифорния), компонента IL-2 примера 1, объединенных 3-мер/4-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], объединенных 3-мер/4-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] и объединенных 1-мер/2-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2].

Пример 14. Исследования эффективности в отношении подкожной меланомы B16F10.

Для оценки эффективности соединений с предполагаемой активностью IL-2 применили весьма надежную модель подкожной меланомы у сингенных мышей, т.е. мышей C57BL/6. Вкратце, один миллион клеток B16F10 имплантировали подкожно в районе середины спины каждой мыши C57BL/6 в возрасте 5-6 недель. Перед рандомизацией и распределением на группы, как показано в табл. 6, опухолям дали возможность вырасти до прощупываемого размера, т.е. 70-120 мм<sup>3</sup>. Мышам ввели тестируемые соединения, т.е. альдеслейкин (Prometheus Laboratories Inc., Сан-Диего, Калифорния), конъюгаты rIL-2-полимер или среду при различных концентрациях дозы и схемах дозирования. Вес тела и объем опухоли измеряли через день. Конечной точкой для этого исследования был момент достижения среднего объема опухоли 1500 мм<sup>3</sup> для указанной группы или 45 дней, в зависимости от того, что наступит ранее.

Таблица 6. Распределение групп для примера 14

Тестируемое соединение	Подгруппа (n=9)	Концентрация дозы (мг/кг)	Путь введения	Доза
Объединенные 3-mer/4-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]	A1	2	IV	q1d
	A2	4		
Объединенные 1-mer/2mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2]	E1	6	IV	q1d
	E2	8		
Альдеслейкин (Prometheus Laboratories Inc.)	C	3	IP	b.i.dx5
	H (n=6)			
Объединенные 3-mer/4-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2]	B1	2	IV	q1d
	B2	4		
Объединенные 1-mer/2-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2]	F1	6	IV	q1d
	F2	9		
Объединенные 1-mer/2-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2]	G1	2	IV	q1d
	G2	4		
Среда: 10 mM ацетат натрия; 150 mM NaCl, pH 4,5; 2% сахара	D	В соответствии с весом тела	IV	q1d
	I			

На фиг. 11А и 11В представлены кривые доза-эффект касательно ингибирования роста опухоли после введения альдеслейкина (Prometheus Laboratories Inc.) и конъюгатов rIL-2-полимер при различных схемах введения. Эти результаты указывают, что протестированные конъюгаты rIL-2-полимер доказали лучшую эффективность при однократной дозе по сравнению с альдеслейкином (Prometheus Laboratories Inc.), что дозировали при 3 мг/кг дважды в день в течение пяти дней.

На фиг. 11А показана зависимость развития опухоли от времени после введения однократной дозы конъюгатов rIL-2-полимер до достижения среднего объема опухоли 1500 мм<sup>3</sup>. Обнаружили, что задержка роста опухоли (TGD) с кривых развития опухоли составляет 4,6 и 6,2 дней, соответственно, для объединенных 3-mer/4-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] при концентрациях дозы 2 и 4 мг/кг. Для объединенных 3-mer/4-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] обнаружили, что TGD составляет 6,4 и 7,6 дней, соответственно, при концентрациях дозы 2 и 4 мг/кг.

На фиг. 11В показана зависимость развития опухоли от времени после введения однократной дозы конъюгатов rIL-2-полимер до достижения среднего объема опухоли 1500 мм<sup>3</sup>. Обнаружили, что TGD с кривых развития опухоли составляет 3,6 и 4,6 дней, соответственно, для объединенных 1-mer/2-mer [mPEG2-C2-fmoc-20K]-[rIL-2] при концентрациях дозы 6 и 8 мг/кг. Для объединенных 1-mer/2-mer [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2] обнаружили, что TGD составляет 3,8 при 2 мг/кг, вместе с тем обнаружили, что концентрация дозы 4 мг/кг по природе является токсической. Обнаружили, что TGD с кривых развития опухоли составляет 2,2 и 3,6 дней, соответственно, для объединенных 1-mer/2-mer [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2] при концентрациях дозы 2 и 4 мг/кг.

Одним словом, как в модели метастатического поражения легкого (пример 13), так и в модели подкожной мышинной меланомы (пример 14) эффективность обеспечивалась с помощью конъюгатов rIL-2-полимер при значительно более низкой частоте дозирования и более низком общем количестве белка по сравнению с альдеслейкином (Prometheus Laboratories Inc.).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуномодулирующий конъюгат, включающий IL-2, содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность, гомологичную на 95% любой из указанных последовательностей, причем IL-2 ковалентно соединен посредством поддающейся разрыву связи с одним или несколькими водорастворимыми полимерами, каждый из которых имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 85 кДа, при этом поддающаяся разрыву связь содержит сложноэфирную группу, выбранную из сложного эфира карбоновой кислоты, сложного эфира фосфорной кислоты, тиолового сложного эфира и сложного ортоэфира, причем в условиях *in vivo* указанная связь поддается разрыву с высвобождением одного или нескольких водорастворимых полимеров.

2. Иммуномодулирующий конъюгат, включающий IL-2, содержащий любую из аминокислотных

последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность, гомологичную на 95% любой из указанных последовательностей, причем IL-2 ковалентно соединен посредством поддающейся разрыву карбаматной связи с одним или несколькими водорастворимыми полимерами, каждый из которых имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 85 кДа, при этом поддающаяся разрыву связь представляет собой карбаматную связь, причем в условиях *in vivo* указанная связь поддается разрыву с высвобождением одного или нескольких водорастворимых полимеров.

3. Конъюгат по любому из пп.1 и 2, где водорастворимый полимер представляет собой разветвленный водорастворимый полимер.

4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где водорастворимый полимер представляет собой полимер, выбранный из поли(алкиленоксида), поли(винилпирролидона), поли(винилового спирта), полиоксазолина и поли(акрилоилморфолина).

5. Конъюгат по п.4, где водорастворимый полимер представляет собой поли(алкиленоксид).

6. Конъюгат по п.5, где поли(алкиленоксид) представляет собой поли(этиленгликоль).

7. Конъюгат по п.6, где поли(этиленгликоль) содержит концевую функциональную группу, выбранную из групп гидроксид и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси.

8. Конъюгат по любому из пп.1-7, где один, два, три, четыре, пять, шесть или семь водорастворимых полимеров присоединены к IL-2.

9. Конъюгат по любому из пп.1-8, где один, два или три водорастворимых полимера присоединены к IL-2.

10. Конъюгат по любому из пп.1-8, где один или два водорастворимых полимера присоединены к IL-2.

11. Конъюгат по любому из пп.1-8, где один водорастворимый полимер присоединен к IL-2.

12. Фармацевтическая композиция для модуляции иммунного ответа у пациента с раковым заболеванием, содержащая конъюгат по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

13. Способ доставки конъюгата, содержащего IL-2, нуждающемуся в этом индивидууму, включающий введение ему фармацевтической композиции по п.12.

14. Способ получения конъюгата по п.1 или 2, включающий приведение в контакт IL-2 с водорастворимым полимером, имеющим среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 85 кДа, в условиях, подходящих для образования поддающейся разрыву связи, выбранной из связи, содержащей сложноэфирную группу, выбранную из сложного эфира карбоновой кислоты, сложного эфира фосфорной кислоты, тиолового сложного эфира и сложного ортоэфира, и карбаматной связи, причем IL-2 представляет собой белок, содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность, гомологичную на 95% любой из указанных последовательностей.

```

1  CATATGCCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAACCCAGCTGCAGCTGGAACATCTGCTGCTG
1  M P T S S S T K K T Q L Q L E H L L L

61  GATCTGCAGATGATCCTGAACGGTATCAACAACACCAAAAAACCCGAACTGACCCGTATG
22  D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M

121  CTGACSTTCAAATTTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAACTGAAACATCTGCAGTGCCTG
40  L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L

181  GAAGAAGAAGTGAACCGCTGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCACAGAGCAAAAACTTCCAT
60  E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H

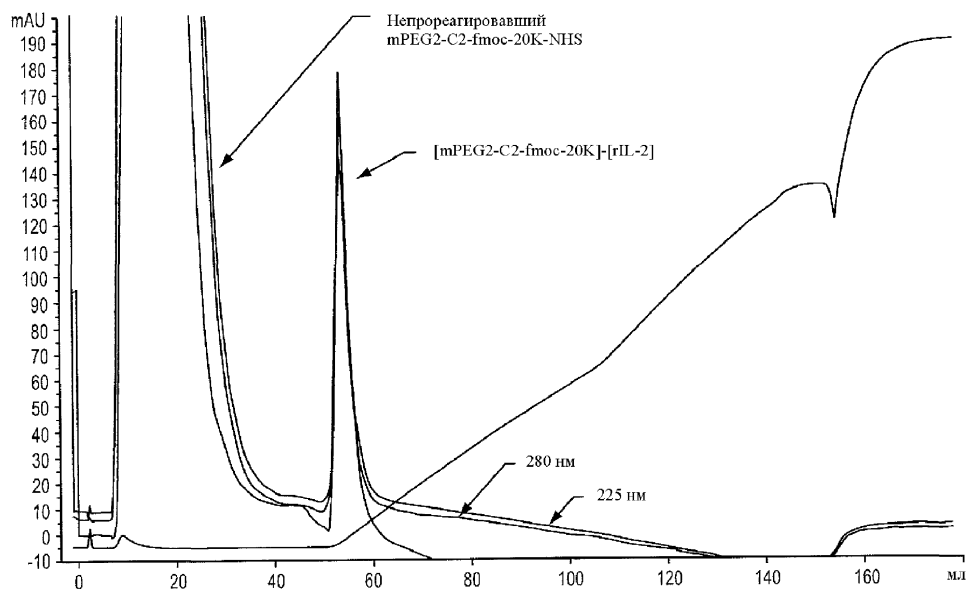
241  CTGCGTCCGCGTGATCTGATCAGCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAACCTGAAAGGMEKAC
80  L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S

301  GAAACCACSTTTCATGTGCGAATACGCAGATGAAACCGCAACCATCGTGGAAATTTCTGAAC
100  E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N

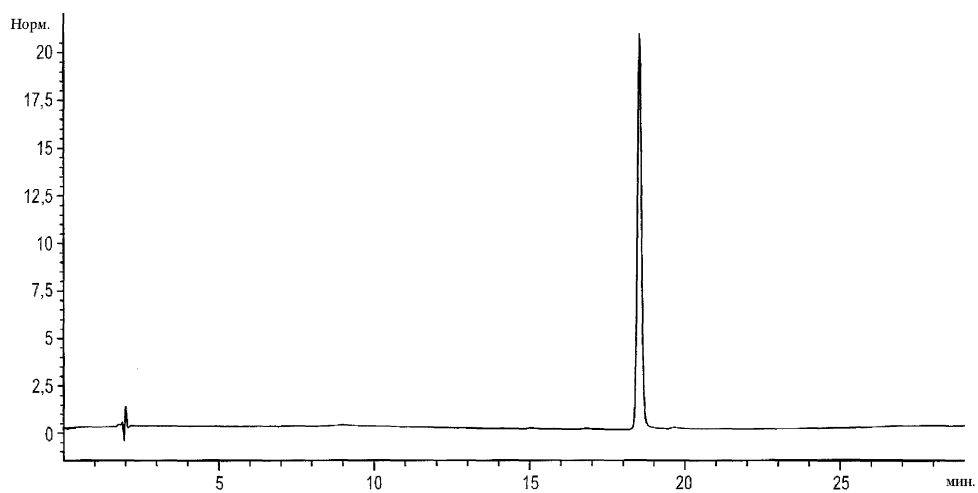
361  CGTTGGATCACSTTTCAGCCAGAGCATCATCAGCACCCCTGACCTAAGAATTC
120  R W I T F S Q S I I S T L T *

```

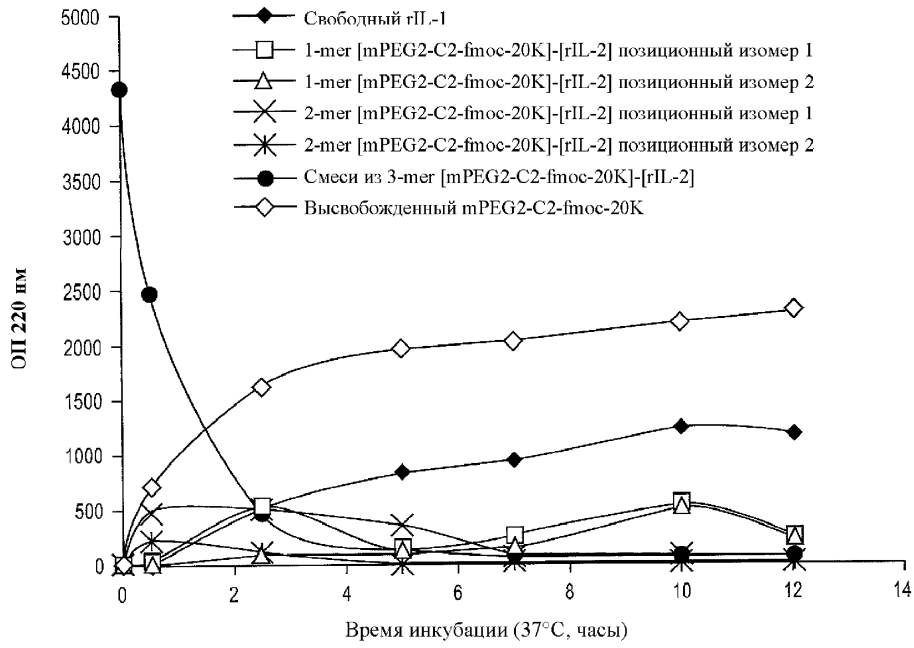
Фиг. 1



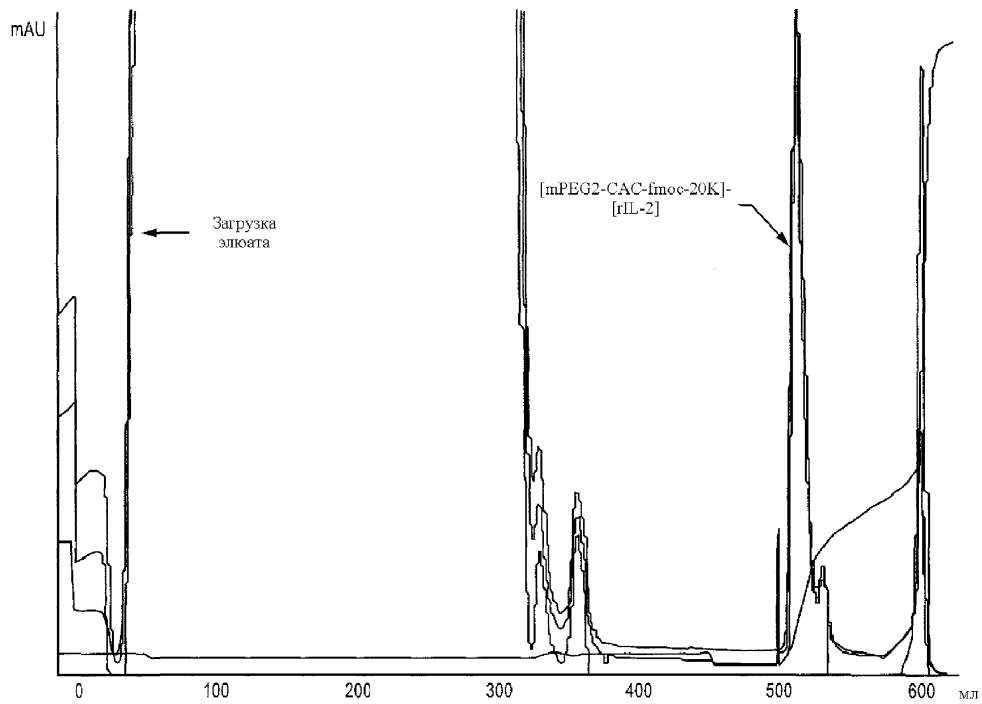
Фиг. 2.1



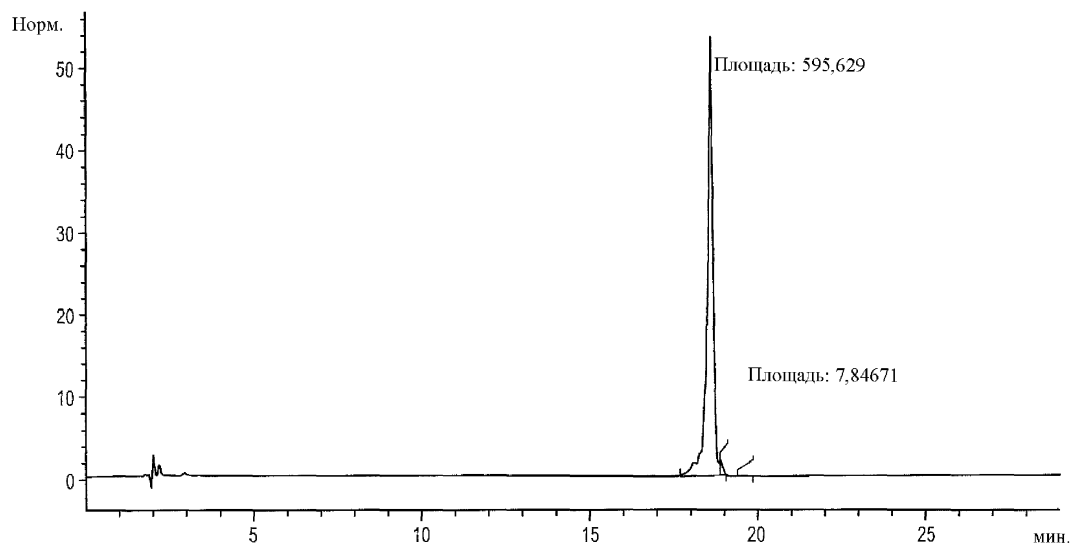
Фиг. 2.2



Фиг. 2.3

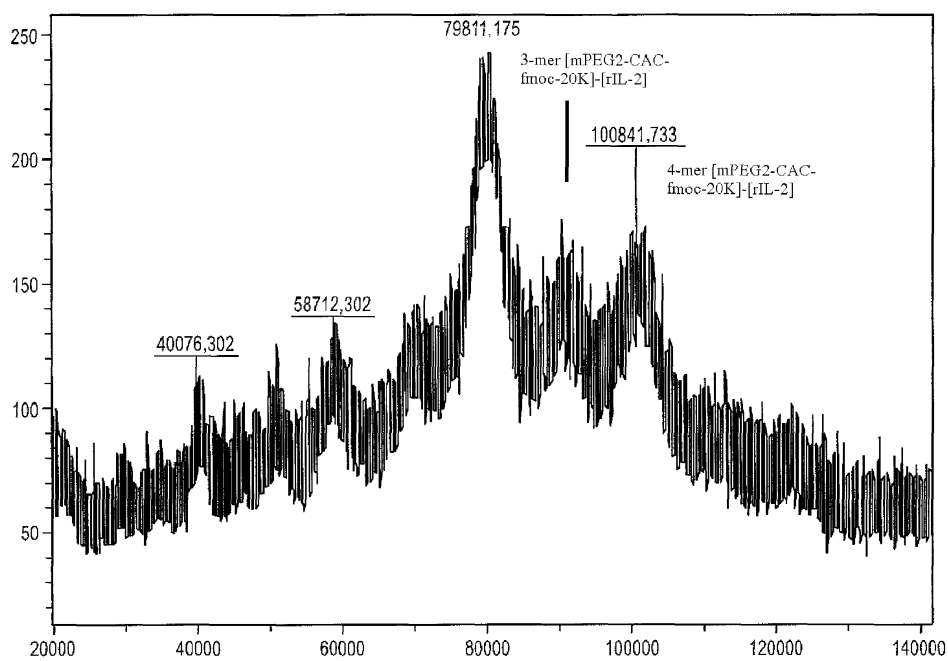


Фиг. 3.1



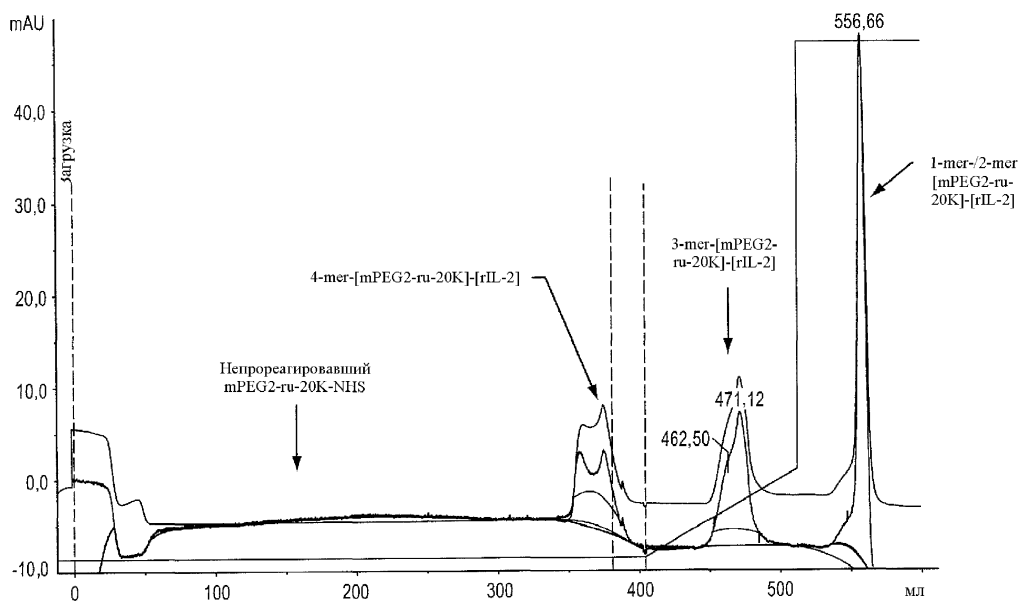
№	Время	Площадь	Высота	Ширина	Площадь, %	Симметрия
1	18,566	595,6	53,5	0,1857	98,522	0
2	18,859	7,8	1,9	0,0701	1,298	0
3	19,547	1,1	8,2E-2	0,1836	0,180	0,615

Фиг. 3.2

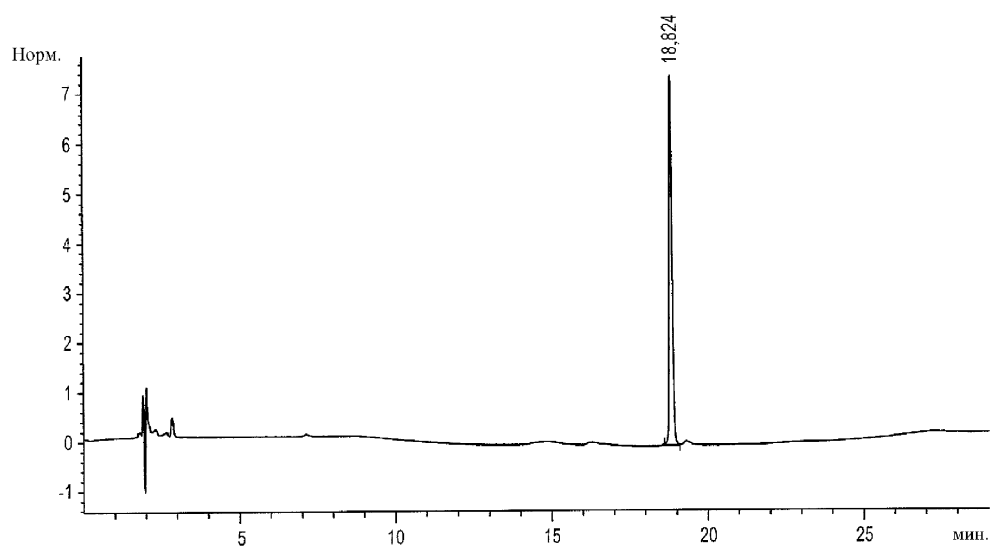


Фиг. 3.3

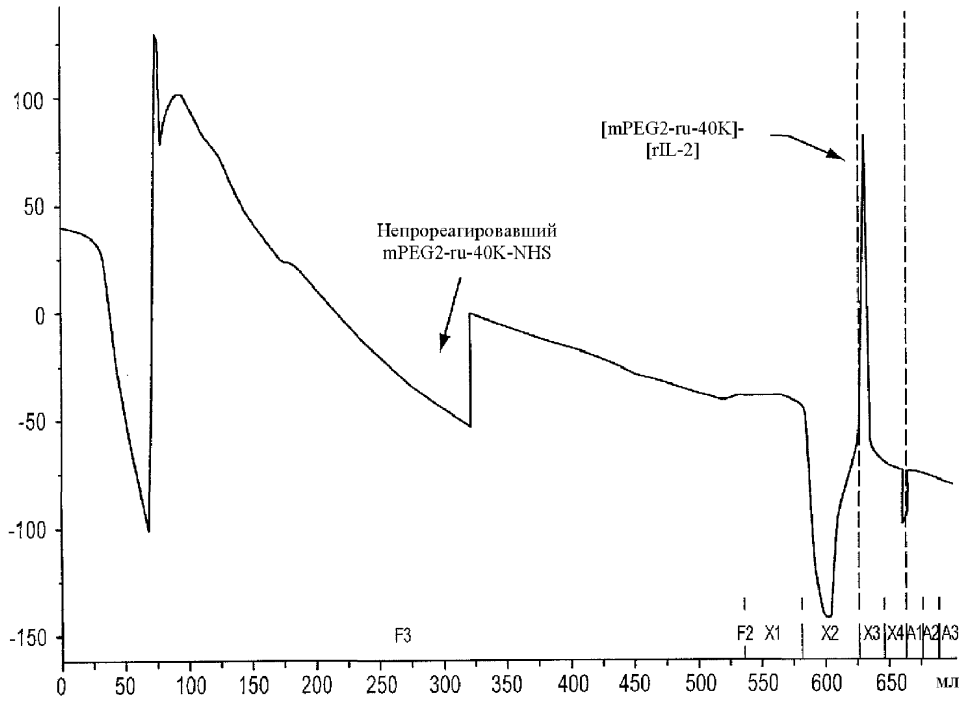




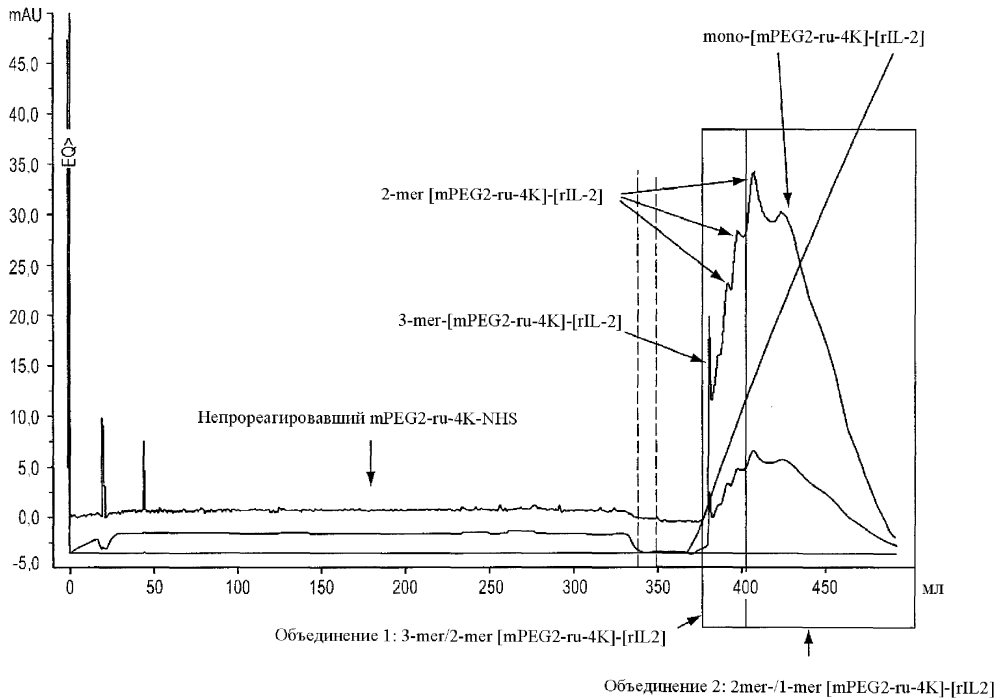
Фиг. 4.1



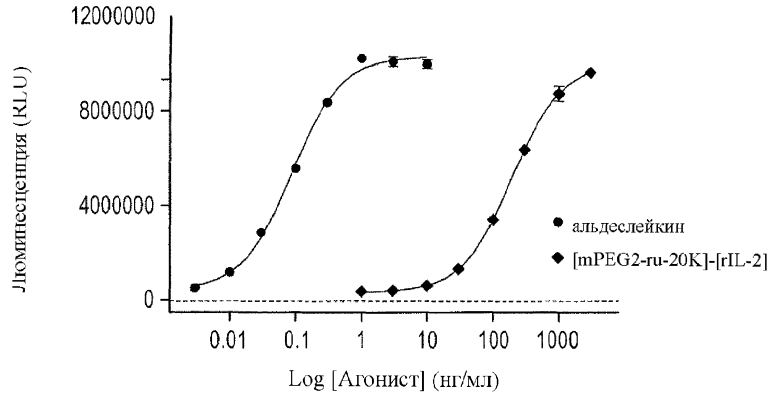
Фиг. 4.2



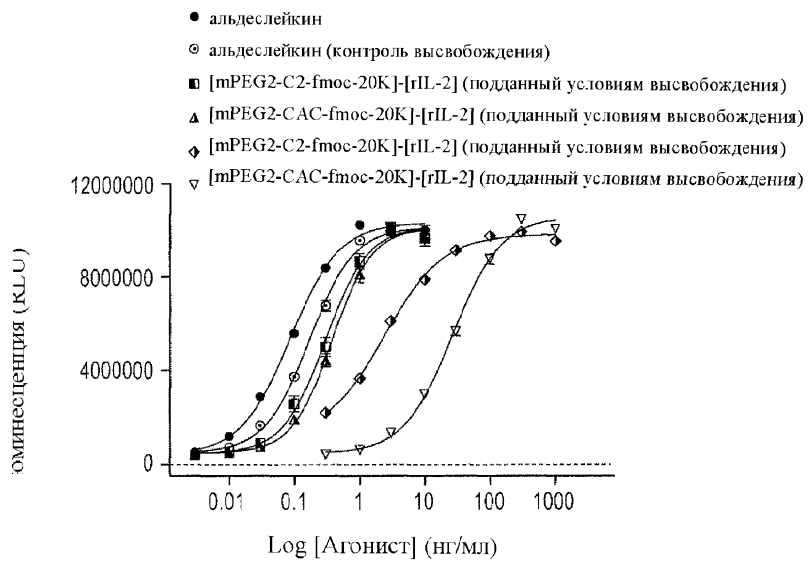
Фиг. 5



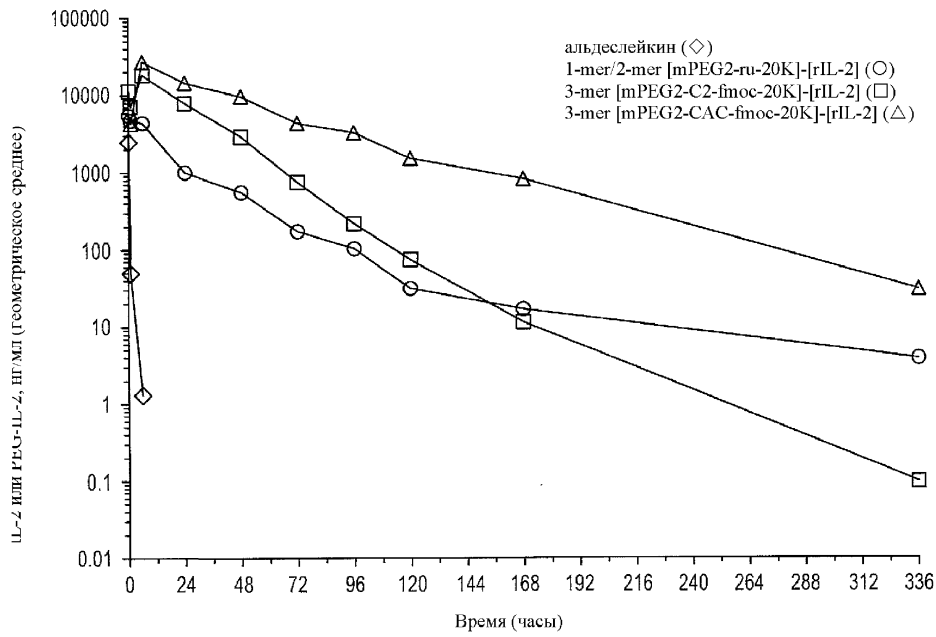
Фиг. 6



Фиг. 7

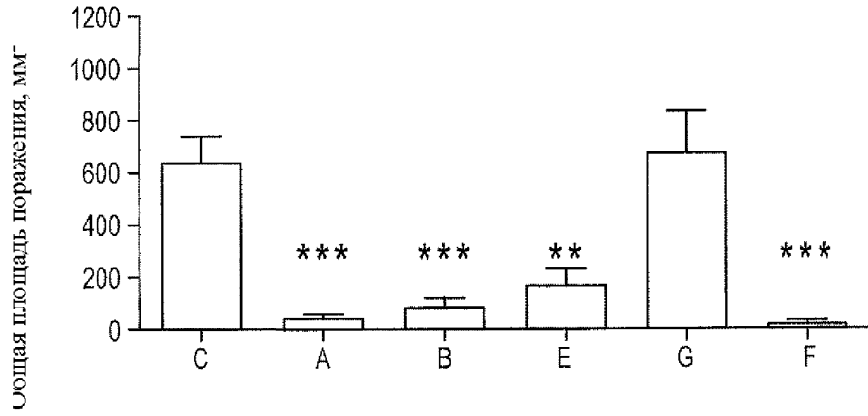


Фиг. 8



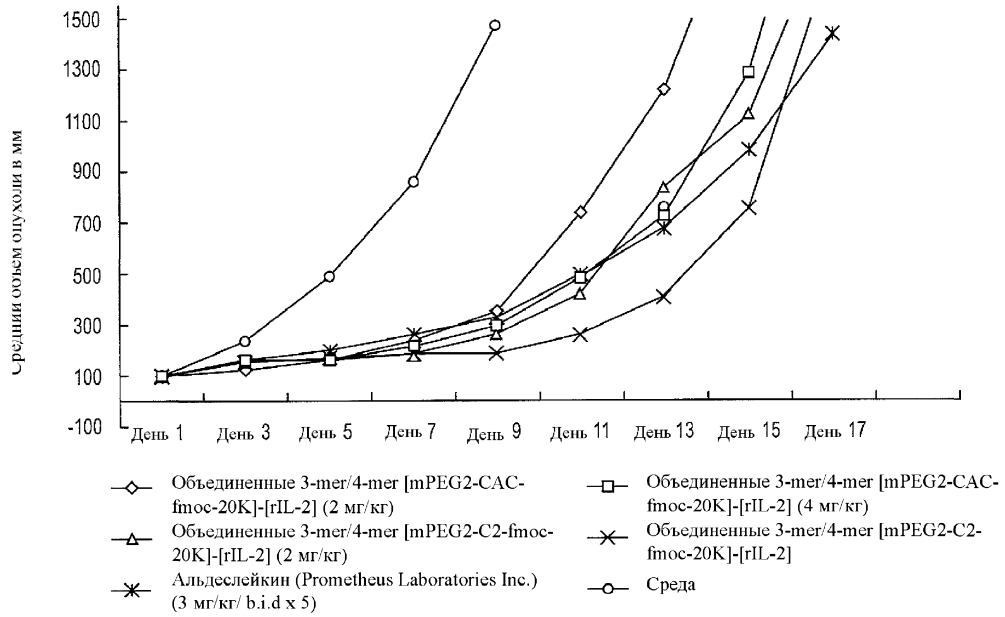
Фиг. 9

C = среда, n=11  
 A = альдеслейкин (Prometheus Laboratories Inc.), n=11  
 B = компонент IL-2 из примера 1, n=12  
 E = объединенные 3-мер/4-мер [mPEG2-CAC-fmoc-20K]-[rIL-2], n=12  
 G = объединенные 3-мер/4-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2], n=10  
 F = объединенные 1-мер/2-мер [mPEG2-ru-20K]-[rIL-2], n=7

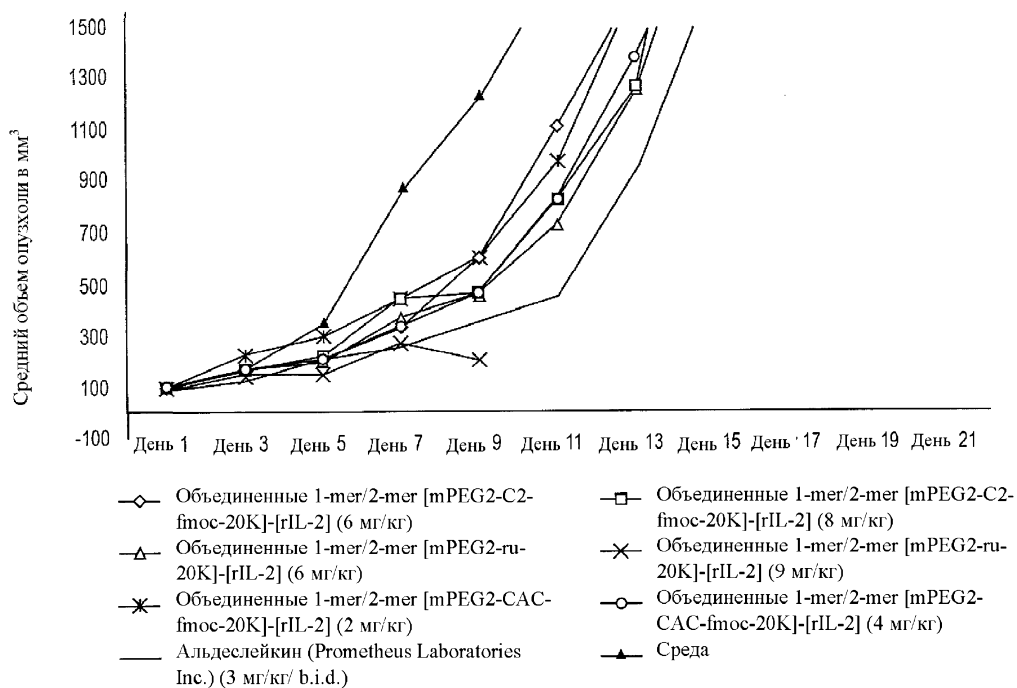


\*\*\* двусторонний критерий Стьюдента в сравнении со средой: P-значение < 0,001  
 \*\* двусторонний критерий Стьюдента в сравнении со средой: P-значение < 0,01

Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2