

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043667**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.09

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(21) Номер заявки
201992716

(22) Дата подачи заявки
2018.05.15

(54) **ДЛИТЕЛЬНО ДЕЙСТВУЮЩИЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-15, СВЯЗАННЫЕ С НИМИ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/506,494; 62/536,966; 62/582,186;
62/648,240**

(56) US-A1-20170035898
WO-A2-2016060996
CN-B-102145178
US-A1-20160022828
WO-A1-2017062832

(32) **2017.05.15; 2017.07.25; 2017.11.06;
2018.03.26**

(33) **US**

(43) **2020.03.17**

(86) **PCT/US2018/032817**

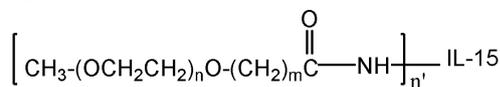
(87) **WO 2018/213341 2018.11.22**

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

(72) Изобретатель:
**Кирк Питер Бенедикт (GB), Чжан
Пин, Брюэр Пэйвэнь Куо (US)**

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

(57) Изобретение предусматривает длительно действующий агонист рецептора IL-15 формулы (I), связанные с ним композиции и способы получения и применения, например, в лечении состояний, отвечающих на терапию, эффективную в отношении обеспечения, например, устойчивой иммунной активации и/или противоопухолевой активности.



Формула (I)

B1**043667****043667****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета в соответствии со статьей 35 U.S.C. 119(E) по предварительной заявке на патент США № 62/506494, поданной 15 мая 2017 г.; и по предварительной заявке на патент США № 62/536966, поданной 25 июля 2017 г.; и по предварительной заявке на патент США № 62/582186, поданной 6 ноября 2017 г.; а также по предварительной заявке на патент США № 62/648240, поданной 26 марта 2018 г., раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится (среди прочего) к длительно действующему агонисту рецептора интерлейкина-15 ("IL-15"), связанным с ним композициям и способам получения и применения, например, в лечении состояний, отвечающих на терапию, эффективную для обеспечения, например, активации устойчивого иммунного ответа и противоопухолевой активности.

Уровень техники

Интерлейкин-15 ("IL-15") представляет собой плеiotропный цитокин, о котором впервые сообщили Grabstein et al. (Grabstein et al. (1994) *Science* 264:965-968). Секретируемый в виде предшественника из 162 аминокислот IL-15 человека содержит лидерную последовательность из 29 аминокислот и пропоследовательность из 19 аминокислот; таким образом, длина зрелого белка составляет 114 аминокислот. Будучи принадлежащим к семейству цитокинов со структурой, представленной пучком из четырех α -спиралей, IL-15 связывается с гетеротримерным рецептором, где уникальная α -субъединица (IL-15R α) обеспечивает специфичность рецептора в отношении IL-15, а β - и γ -субъединицы данного рецептора имеют общие черты с одним или несколькими другими рецепторами цитокинов. Giri et al. (1995) *EMBO J.* 14:3654-3663.

Как цитокин, IL-15 обладает эффектами как в отношении врожденной иммунной системы, так и в отношении адаптивной иммунной системы (DiSabitino et al. (2011) *Cytokine Growth Factor Rev.* 22:19-33). Что касается врожденной иммунной системы (которая в целом защищает хозяина от чужеродных организмов), то IL-15 обуславливает развитие естественных клеток-киллеров ("NK-клеток") и естественных киллерных Т-клеток ("NK-Т-клеток") и обеспечивает поддержание их выживания наряду с обладанием другими свойствами. С учетом их роли во врожденной иммунной системе NK-клетки специфически не атакуют вторгающегося патогена, а скорее эти клетки разрушают дефектные клетки хозяина (такие как опухолевые клетки или инфицированные вирусом клетки). NK-Т-клетки продуцируют иммуномодулирующие цитокины, в частности интерферон- γ , которые приводят к общей активации иммунного ответа.

Что касается адаптивной иммунной системы (которая защищает хозяина от специфического чужеродного организма после первоначального столкновения с этим конкретным патогеном), то IL-15 необходим для поддержания хелперных Т-клеток, продуцирующих иммуномодулирующие цитокины. Важно отметить, что IL-15 также содействует долгосрочному поддержанию "обученных антигеном" Т-клеток памяти, которые обладают способностью быстрого размножения, тем самым обеспечивая более быстрый и более сильный иммунный ответ при повторном воздействии конкретного чужеродного патогена, вторгающегося в организм хозяина.

Наконец, несмотря на свои специфические роли как во врожденной, так и в адаптивной иммунных системах, IL-15 оказывает значительные и обширные эффекты в обеих категориях иммунных систем. В частности, IL-15 подавляет апоптоз (или гибель клеток) или уменьшает его степень у ряда типов клеток (включая дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, CD4+ Т-клетки и В-клетки), ассоциированных с обеими категориями иммунных систем.

Поскольку он стимулирует пролиферацию и поддержание многих клеток иммунной системы, которые могут бороться с клетками, которые представляются чужеродными (или "не своими") для хозяина, IL-15 был предложен для применения в способах лечения индивидуумов, страдающих от рака (Steel et al. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.* 33(1):35-41). Например, агонист на основе IL-15 был предложен для лечения форм миеломы (Wong et al. (2013) *OncoImmunology* 2(11), e26442:1-3). Кроме того, было предложено фармакотерапевтическое средство на основе IL-15 для лечения индивидуумов, страдающих вирусными инфекциями, такими как инфекция HIV.

Несмотря на свой потенциал для применения в лечении индивидуумов, страдающих от ряда заболеваний, средства терапии на основе IL-15 сталкиваются с рядом проблем. Например, IL-15 быстро выводится из плазмы крови и является относительно нестабильным в физиологических условиях. Более того, активность IL-15 в отношении передачи сигнала *in vivo* также кратковременна, и для оптимальной активности данной молекулы требуется ежедневное введение дозы или многодневная непрерывная инфузия, что является неудобным. В попытке преодолеть данные ограничения определенные подходы предусматривают образование комплекса IL-15 с альфа-субъединицей рецептора IL-15. Однако такой подход может аннулировать необходимую передачу сигналов, которая происходит уникально через альфа-рецептор IL-15, экспрессируемый на многих типах клеток. Сообщалось о необратимом пегилировании с полимером с сукцинимидилкарбонатом на конце с относительно небольшой молекулярной массой (5 кДа), но это приводило к значительному изменению биологической активности IL-15. Pettit et al. (1997) *J.*

Biol. Chem. 272(4):2312-2318.

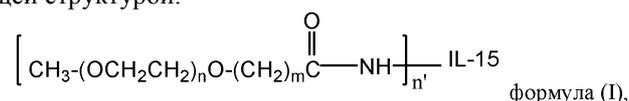
Однако, несмотря на вышеизложенные подходы, сохраняется потребность в новых агонистах рецептора IL-15, обладающих улучшенными характеристиками и профилями, такими как, например, сильные иммуностимулирующие эффекты, низкая системная токсичность, стабильность и/или улучшенные фармакокинетические показатели. Таким образом, среди прочего, в настоящем изобретении представлены длительно действующий агонист рецептора IL-15, обладающий рядом преимущественных признаков, которые будут описаны более подробно ниже, а также композиции и наборы, содержащие такой агонист, а также связанные с ними способы получения и применения, описанные в данном документе, которые считаются новыми и полностью не раскрытыми в уровне техники.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте в данном документе представлен длительно действующий агонист рецептора IL-15, в том числе его фармацевтически приемлемые солевые формы. Длительно действующий агонист рецептора IL-15 (IL-15-R) содержит по меньшей мере один фрагмент, представляющий собой линейный PEG (полиэтиленгликоль), стабильно ковалентно присоединенный к аминокгруппе IL-15 посредством амидной связи. Между линейной цепью PEG и стабильной амидной связью с аминокгруппой IL-15 может находиться линейная незамещенная алкиленовая группа $(-CH_2)_m$, содержащая от 2 до 5 атомов углерода (т.е. $m=2, 3, 4$ или 5).

Например, в некоторых вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_2$; или в некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_3$; в еще некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_4$; в еще некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_5$.

Например, в некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется следующей структурой:



где IL-15 представляет собой фрагмент, представляющий собой интерлейкин-15, n представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000; m представляет собой целое число от 2 до 5 (например, 2, 3, 4 или 5) и n' равняется 1. Формула (I) также может быть изображена как $[CH_3O-(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mC(O)-NH]_{n'}-IL15$, и данные две формулы могут использоваться взаимозаменяемо. В формуле I (и в подобных формулах, представленных в данном документе) $-NH-$ в структуре представляет собой аминокгруппу фрагмента, представляющего собой IL-15.

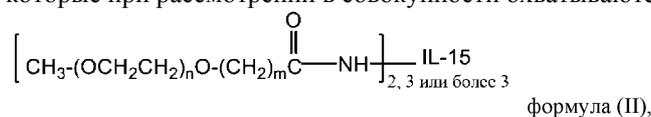
В некоторых дополнительных вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 200 до приблизительно 2000, или от приблизительно 400 до приблизительно 1300, или от приблизительно 450 до приблизительно 1200.

В еще одном или нескольких дополнительных вариантах осуществления m равняется 2 или 3, так что линейная алкиленовая группа, отделяющая фрагмент PEG от стабильной амидной связи с IL-15, представляет собой $(-CH_2)_2$ - либо $(CH_2)_3$ -. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления m равняется 3.

В одном или нескольких вариантах осуществления n представляет собой целое число, имеющее значение, которое соответствует полимеру полиэтиленгликолю, характеризующемуся значением средневесовой молекулярной массы, выбранным из группы, состоящей из 10000 дальтон (например, n равняется ~227), 15000 дальтон (например, n равняется ~340), 20000 дальтон (например, n равняется ~454), 25000 дальтон (например, n равняется ~568), 30000 дальтон (например, n равняется ~681), 40000 дальтон (например, n равняется ~909), 50000 дальтон (например, n равняется ~1136) и 60000 дальтон (например, n равняется ~1364).

В одном или нескольких иллюстративных вариантах осуществления представлена композиция, содержащая длительно действующий агонист рецептора IL-15 согласно формуле (I), в том числе без ограничения каждый из его связанных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 15 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой

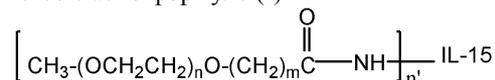


где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I). То есть, что касается компонента таких композиций, представляющего собой длительно действующий агонист рецептора IL-15, не более приблизительно 15 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, содержащихся в композиции, представлены формулой (II).

Например, в некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 10 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой (II).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного композиция содержит не более приблизительно 7 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, характеризующихся n' , равным 2, 3 или более 3 (т.е. полимеры с более высоким количеством звеньев PEG, также называемые "полимерами с большим количеством звеньев"). В еще одних вариантах осуществления композиция содержит не более приблизительно 5 мол.%, 6 мол.%, 9 мол.% или 10 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15, характеризующихся n' , равным 2, 3 или более 3 (т.е. 2 или больше).

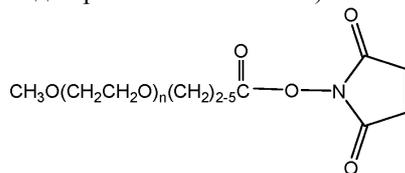
В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция содержит длительно действующий агонист рецептора IL-15 согласно формуле (I)



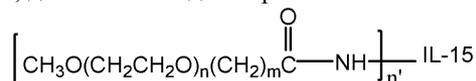
где n и m описаны выше

и n' представляет собой среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов, ковалентно присоединенных к аминокетонам IL-15 (для композиции), и n' для композиции находится в диапазоне от 1,0 до приблизительно 1,3. Например, среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов на фрагмент, представляющий собой IL-15, выбрано из приблизительно 1,0, 1,1, 1,2 и приблизительно 1,3.

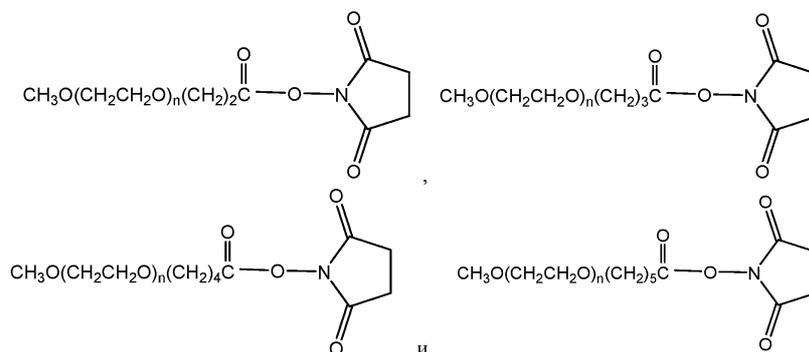
В еще одном аспекте в данном документе представлен способ получения длительно действующего агониста рецептора интерлейкина-15, такого как описанный в формуле (I), например формулах (Ia), (Ib), (Ic), (Id), и в формуле (II), например (IIa), (IIb), (IIc) и (IId). В данном способе интерлейкин-15 (как правило, растворенный в буфере, таком как фосфатно-солевой буферный раствор или любой другой подходящий буфер со значением pH около 7 (например, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6)) вводят в реакцию с активированным реагентом PEG, таким как метокси-PEG-сукцинимидилалканат (где n представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000) согласно следующей структуре:



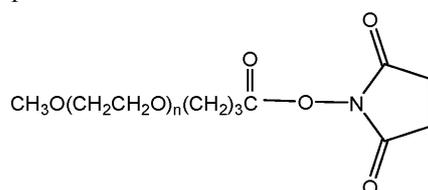
в течение периода времени, достаточного для образования



где n' равняется 1. Иллюстративные реагенты, представляющие собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, для введения в реакцию с интерлейкином-15 включают следующие:



В некоторых предпочтительных вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, представляет собой



mPEG-сукцинимидилбутаноат.

В некоторых вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, характеризуется значением средневесовой молекулярной массы, выбранным из группы, состоящей из приблизительно 10000 дальтон (например, n равняется ~227), приблизительно 15000 дальтон (например, n равняется ~340), приблизительно 20000 дальтон (например, n равняется ~454), приблизительно 25000 дальтон (например, n равняется ~568), приблизительно 30000 дальтон (например, n равняется ~681), приблизительно 40000 дальтон (например, n равняется ~909), приблизительно 50000 дальтон (например, n равняется ~1136) и приблизительно 60000 дальтон (например, n равняется ~1364).

В одном или нескольких вариантах осуществления способа реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, добавляют в эквимольном количестве (т.е. эквимольном соотношении) по отношению к интерлейкину-15.

В одном или нескольких альтернативных вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, добавляют в молярном избытке по отношению к интерлейкину-15. В некоторых конкретных вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, присутствует в 2-кратном молярном избытке, или 5-кратном молярном избытке, или 7-кратном молярном избытке, или десятикратном молярном избытке, или даже 12-кратном молярном избытке или больше. В некоторых вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, добавляют в 5-10-кратном молярном избытке.

В некоторых вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, добавляют в виде твердого вещества.

В некоторых других вариантах осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, растворяют в подходящем растворителе. В конкретном варианте осуществления реагент, представляющий собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, растворяют в водном растворе кислоты, как, например, в разбавленной хлористоводородной кислоте, хотя можно использовать любую подходящую кислоту.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления способа интерлейкин-15 изначально присутствует в растворе, т.е. до смешивания с реагентом, представляющим собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, в концентрации от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/мл. Дополнительные иллюстративные диапазоны значений концентрации включают, например, от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг/мл интерлейкина-15, от приблизительно 0,5 до приблизительно 3 мг/мл и от приблизительно 1,0 до приблизительно 4 мг/мл интерлейкина-15.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления значение pH раствора интерлейкина-15 регулируют до приблизительно 8,0 перед добавлением реагента, представляющего собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления значение pH реакционной смеси регулируют до приблизительно 8,0 после добавления реагента, представляющего собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат.

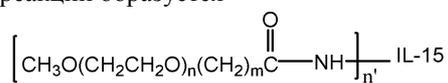
В некоторых дополнительных вариантах осуществления полученную реакционную смесь перемешивают (или смешивают) в течение периода времени, достаточного для осуществления реакции между реагирующими веществами. В некоторых вариантах осуществления реагирующие вещества смешивают в течение от приблизительно 15 мин до приблизительно 10 ч включительно. В некоторых дополнительных вариантах осуществления реагирующие вещества смешивают в течение от приблизительно 30 мин до приблизительно 5 ч или от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 ч.

В некоторых вариантах осуществления реакцию осуществляют в условиях окружающей среды, например, при комнатной температуре, т.е. в отсутствие дополнительного нагревания. Иллюстративные диапазоны значений температуры для осуществления реакции включают, например, от приблизительно 5 до приблизительно 50°C, или от приблизительно 10 до приблизительно 40°C, или от приблизительно 15 до приблизительно 30°C. В некоторых дополнительных вариантах осуществления реакцию осуществляют при температуре от приблизительно 20 до приблизительно 25°C.

В некоторых вариантах осуществления способа реакционную смесь гасят путем добавления аминокислоты. В некоторых связанных вариантах осуществления реакционную смесь гасят путем добавления глицина.

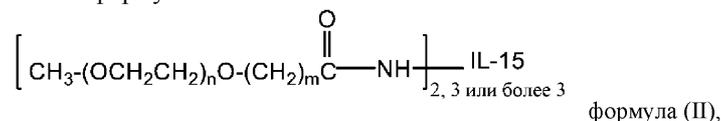
В некоторых дополнительных вариантах осуществления способа продукты конъюгации, т.е. конъюгаты на основе метокси-PEG-алканата и интерлейкина-15, выделяют из реакционной смеси.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления реакционную смесь, содержащую конъюгаты на основе метокси-PEG-алканата и интерлейкина-15, очищают. В некоторых конкретных вариантах осуществления в результате реакции образуется



где n' равняется 1.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления реакция эффективна для образования композиции, содержащей не более приблизительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (из молекул, содержащих IL-15, в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой:



где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I).

В еще одних дополнительных вариантах осуществления реакция эффективна для получения пегилированного интерлейкина-15, который на менее 20-35% или менее приблизительно 25% деамидирован.

В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 7-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с немодифицированным (т.е. неконъюгированным) IL-15. Например, в одном или нескольких родственных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 6,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 6-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 5,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 4,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 4-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 3,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или даже не более приблизительно 3-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с IL-15.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 50% снижением связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с неконъюгированным IL-15, например, при измерении с применением методики, подходящей для определения степени связывания альфа-рецептора, такой как, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR). В некоторых связанных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 45% снижением степени связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или характеризуется не более приблизительно 40% снижением степени связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или характеризуется не более приблизительно 35% снижением степени связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или даже характеризуется не более приблизительно 30% снижением степени связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с неконъюгированным IL-15.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 7-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с немодифицированным IL-15 и не более приблизительно 50% снижением степени связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с IL-15, включая любую одну или несколько конкретных комбинаций снижения значений EC50 или значений K_D , описанных выше.

В еще одном или нескольких вариантах осуществления представлена композиция, содержащая длительно действующий агонист IL-15-R, описанный в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15-R или композиция на его основе эффективны при введении субъекту в терапевтически эффективной дозе для стимулирования активации и/или пролиферации НК.

В еще одном или нескольких дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15-R или композиция на его основе эффективны при введении субъекту в терапевтически эффективной дозе для поддержания выживания CD8 T-клеток и/или формирования клеток памяти.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения состояния, которое отвечает на лечение с помощью IL-15, путем введения субъекту, имеющему состояние, терапевтически эффективной дозы длительно действующего агониста IL-15-R или композиции, содержащей такой агонист, представленных в данном документе.

В еще одном дополнительном аспекте представлен способ лечения рака путем введения субъекту, имеющему рак, терапевтически эффективной дозы длительно действующего агониста IL-15-R или композиции, представленных в данном документе.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изложены в следующем описании и формуле изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена аминокислотная последовательность иллюстративного рекомбинантного IL-15 человека из *E. coli* (SEQ ID NO: 1), одинарная негликозилированная полипептидная цепь, содержащая 115 аминокислот, с молекулярной массой 12,9 кДа.

Фиг. 2 представляет собой хроматограмму, иллюстрирующую анализ иллюстративной смеси для реакции конъюгации посредством RP-HPLC, как описано в примере 1.

Фиг. 3 представляет собой профиль очистки FPLC из анион-обменной хроматографической колонки, как описано в примере 1.

Фиг. 4 представляет собой SDS-PAGE иллюстративного очищенного длительно действующего агониста рецептора IL-15, моно-mPEG-бутанамид-IL-15, как описано в примере 1. Полоса 1 представляет указанные маркеры молекулярной массы; полоса 2 представляет неконъюгированную исходную молекулу IL-15, и полоса 3 представляет моно-mPEG-бутанамид-IL-15.

Фиг. 5 представляет собой анализ очищенного моно-mPEG-бутанамид-IL-15 посредством RP-HPLC, как описано в примере 1.

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию тестируемого изделия (IL-15, закрашенный кружок, или mPEG2-CAC-FMOC-20K-NHS-IL-15, также называемого N-(2-метокси-PEG-этил)-7-(4-((2-метокси-PEG-этил)амино)-4-оксобутил)-9-этил-9Н-флуорен-4-карбоксамид-карбамат-IL-15, или конъюгата 2, закрашенный квадрат) в плазме крови у мышей со временем после введения однократной внутривенной дозы тестируемого изделия, как описано в примере 6.

Фиг. 7 представляет собой график, демонстрирующий среднюю концентрацию mPEG2-CAC-FMOC-20K-NHS-IL-15, также называемого N-(2-метокси-PEG-этил)-7-(4-((2-метокси-PEG-этил)амино)-4-оксобутил)-9-этил-9Н-флуорен-4-карбоксамид-карбамат-IL-15 или конъюгатом 2, в плазме крови у крыс со временем после введения однократной внутривенной дозы конъюгата 2, при этом величина дозы составляет 0,3 (■), 0,15 (▲) и 0,075 мг/кг (●), или однократной подкожной дозы конъюгата 2, составляющей 0,15 мг/кг (◆), как описано в примере 7.

На фиг. 8А и 8В проиллюстрирована степень фосфорилирования STAT5 в различных лимфоцитах, т.е. CD4 Т-клетках (■), CD8 Т-клетках (▲) и NK-клетках (▼), после введения однократной i.v. дозы IL-15 (фиг. 8А) либо конъюгата 2 (0,3 мг/кг, фиг. 8В), как описано в примере 8.

Фиг. 9А, 9В и 9С представляют собой графики, демонстрирующие степень фосфорилирования STAT5 в различных лимфоцитах, т.е. CD4 Т-клетках, CD8 Т-клетках и NK-клетках соответственно, у яванских макаков после введения однократной i.v. дозы конъюгата 2 (0,5 мг/кг), как описано в примере 9.

Фиг. 10А и 10В представляют собой графики, демонстрирующие активность in-vitro иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (конъюгатов 1, 3 и 5), как измерено с помощью передачи сигнала в субпопуляциях NK человеческих PBMC, CD56bright (фиг. 10А) и CD56dim (фиг. 10В) NK-клеток соответственно, как подробно описано в примере 10.

Фиг. 11А и 11В представляют собой графики, иллюстрирующие пролиферацию NK-клеток у мышей после i.v. введения моно-mPEG-SBA40K-IL-15 (также называемого в данном документе конъюгатом 1) в дозах, составляющих 0,03 мг/кг (низкая доза, незакрашенные квадраты), 0,3 мг/кг (средняя доза, закрашенные кружки, сплошная линия) или 1 мг/кг (высокая доза, ромбы), по сравнению со средой-носителем, как описано в примере 11. На фиг. 11А проиллюстрирована экспрессия Ki67 (выраженная в процентном отношении) со временем, тогда как на фиг. 11В проиллюстрированы количества NK-клеток (клетки/мкл) в зависимости от времени после введения для каждой из групп образцов.

Фиг. 12А-Д представляют собой графики, иллюстрирующие увеличение количества NK-клеток всех уровней зрелости у мышей после i.v. введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 мг/кг (низкая доза, незакрашенные квадраты), 0,3 мг/кг (средняя доза, закрашенные кружки, сплошная линия) или 1,0 мг/кг (высокая доза, ромбы), по сравнению со средой-носителем (закрашенные кружки, пунктирная линия), как описано в примере 11. Субпопуляции NK-клеток определяли по экспрессии CD11b и CD27. На фиг. 12А продемонстрировано увеличение количества терминально-дифференцированных эффекторных клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения; на фиг. 12В продемонстрировано увеличение количества предшественников NK-клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения; на фиг. 12С продемонстрировано увеличение количества высокоэффекторных клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения, и на фиг. 12Д продемонстрировано увеличение количества ранних NK-клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения.

Фиг. 13А и 13В представляют собой графики, иллюстрирующие уровни экспрессии NKG2D (фиг. 13А) и гранзима В (фиг. 13В) NK-клетками у мышей после i.v. введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 мг/кг (низкая доза, незакрашенные квадраты), 0,3 мг/кг (средняя доза, закрашенные кружки, сплошная линия) или 1 мг/кг (высокая доза, ромбы), по сравнению со средой-носителем (закрашенные кружки, пунктирная линия), как описано в примере 11.

Фиг. 14 представляет собой график, иллюстрирующий количества CD8 Т-клеток у мышей, выраженные в клетках/мкл, как перед введением дозы, так и в период от 24 до 120 ч после введения, после i.v. введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 мг/кг (низкая доза), 0,3 мг/кг (средняя доза) или 1 мг/кг (высокая доза), как описано в примере 11.

Фиг. 15А и 15В представляют собой графики, иллюстрирующие уровни экспрессии Ki67 (выраженные в процентном отношении) со временем для эффекторных Т-клеток памяти и центральных Т-клеток памяти соответственно, у мышей в зависимости от времени после введения, после i.v. введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,3 или 1,0 мг/кг, по сравнению со средой-носителем и IL-15, как описано в примере 11.

Фиг. 16А и 16В представляют собой графики, иллюстрирующие пролиферацию NK-клеток у яванских макаков после *i.v.* введения конъюгата 2 в дозе, составляющей 500 мкг/кг, как описано в примере 12. На фиг. 16А проиллюстрирована экспрессия Кi67 (выраженная в процентном отношении) в NK-клетках в период от момента перед введением дозы до 15 дней после введения, тогда как на фиг. 16В проиллюстрированы количества NK-клеток в период от момента перед введением дозы до 15 дней после введения.

Фиг. 17 представляет собой график, иллюстрирующий количества CD8 T-клеток у яванских макаков (показано для каждого животного) после *i.v.* введения конъюгата 2 в дозе, составляющей 500 мкг/кг, как описано в примере 12, в период от момента перед введением дозы до 14 дней после введения.

Фиг. 18А и 18В представляют собой графики, иллюстрирующие количества эффекторных CD8 T-клеток памяти (T_{EM}-клеток) и центральных CD8 T-клеток памяти (T_{EM}) соответственно, у яванских макаков в зависимости от времени после введения (в период от момента перед введением дозы до 14 дней после введения), после *i.v.* введения конъюгата 2 в дозе, составляющей 500 мкг/кг, как описано в примере 12.

На фиг. 19 проиллюстрированы суммарные количества повреждений на мышь в легких самок мышей Balb/c, которым инокулировали клетки СТ-26 рака толстой кишки мыши, с последующей обработкой одним из следующих тестируемых изделий: средой-носителем, фосфатно-солевым буферным раствором (группа А); нативным IL-15 в отдельности (группа В); конъюгатом 2 в дозе, составляющей 0,03 мг/кг (группа С); конъюгатом 2 в дозе, составляющей 0,1 мг/кг (группа D); конъюгатом 2 в дозе, составляющей 0,3 мг/кг (группа Е); конъюгатом 2 в дозе, составляющей 1,0 мг/кг (группа F); конъюгатом 2 в дозе, составляющей 3,0 мг/кг (группа G), как подробно описано в примере 13.

На фиг. 20 проиллюстрированы суммарные количества повреждений на мышь в легких самок мышей Balb/c, которым инокулировали клетки СТ-26 рака толстой кишки мыши, с последующей обработкой одним из следующих тестируемых изделий: средой-носителем, фосфатно-солевым буферным раствором (группа А); конъюгатом 1 в дозе, составляющей 0,03 мг/кг (группа H), и конъюгатом 1 в дозе, составляющей 0,3 мг/кг, как подробно описано в примере 13.

На фиг. 21 проиллюстрирован процент специфического лизиса в зависимости от соотношения Е:Т (эффектор:мишень) при дозах 1000 нг/мл (квадраты), 3000 нг/мл (кружки), 300 нг/мл (треугольники), 30 нг/мл (верхние X), 3 нг/мл (ромбы) и без стимуляции (нижние X), как описано в примере 14. Эти данные иллюстрируют дозозависимое увеличение цитотоксичности NK-клеток *in vitro* после культивирования с конъюгатом 1.

Фиг. 22А-Д представляют собой графики, иллюстрирующие увеличивающиеся количества NK-клеток всех уровней зрелости у мышей после *i.v.* введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 1,5 мг/кг, как описано в примере 11. На фиг. 22А продемонстрировано увеличение количества терминально-дифференцированных эффекторных клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения; на фиг. 22В продемонстрировано увеличение количества предшественников NK-клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения; на фиг. 22С продемонстрировано увеличение количества высокоэффекторных клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения, и на фиг. 22D продемонстрировано увеличение количества ранних NK-клеток, выраженных в клетках/мкл, в период от 24 до 120 ч после введения.

Фиг. 23 представляет собой график, иллюстрирующий экспрессию гранзима В в зависимости от времени после обработки конъюгатом 1 в дозах, составляющих 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 и 1,5 мг/кг, как описано в примере 15. Эти данные указывают на то, что обработка конъюгатом 1 обеспечивает увеличение уровня экспрессии гранзима В в NK-клетках.

Фиг. 24 представляет собой график, иллюстрирующий количества CD8 T-клеток, выделенных из селезенки мыши, выраженные в клетках/мкл, как перед введением дозы, так и в период от 24 до 96 ч после введения, у мышей после *i.v.* введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 мг/кг (закрашенные кружки, пунктирная линия) и 0,3 мг/кг (закрашенные кружки, сплошная линия), буфера на основе среды-носителя IL-15 (незакрашенные кружки, пунктирная линия), как описано в примере 11.

Фиг. 25 представляет собой график, иллюстрирующий уровни экспрессии Кi67 (выраженные в процентном отношении) для CD49b клеток у мышей в зависимости от времени после введения, после *i.v.* введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 или 0,3 мг/кг, по сравнению с буфером на основе среды-носителя IL-15, как описано в примере 11.

Фиг. 26 представляет собой график, иллюстрирующий уровни экспрессии гранзима В (выраженные в процентном отношении) для CD49b клеток у мышей в зависимости от времени после введения, после *i.v.* введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 или 0,3 мг/кг, по сравнению с буфером на основе среды-носителя IL-15, как описано в примере 11.

Фиг. 27 представляет собой график, иллюстрирующий результаты цитотоксичности *in vivo* после обработки конъюгатом 1 в дозе 0,3 мг/кг, как описано в примере 14. Цитотоксичность оценивали через 24, 48 и 72 ч после обработки.

Фиг. 28А-Д представляют собой графики, иллюстрирующие увеличивающиеся количества NK-

клеток всех уровней зрелости у мышей после *i.v.* введения конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,03 мг/кг и 0,3 мг/кг, в виде однократной дозы или после третьей дозы по схеме $q7dx3$, как описано в примере 11. На фиг. 28А продемонстрировано увеличение процентного содержания экспрессирующих Ki67 CD49b клеток в период от 24 до 240 ч после введения; на фиг. 22В продемонстрировано увеличение процентного содержания экспрессирующих гранзим В CD49b клеток в период от 24 до 240 ч после введения; на фиг. 28С продемонстрировано увеличение количества CD49b клеток, выраженного в клетках/мкл, в период от 24 до 240 ч после введения; и на фиг. 28D продемонстрировано увеличение процентного содержания granB+ MFI CD49b клеток в период от 24 до 240 ч после введения.

Фиг. 29А-С представляют собой графики, касающиеся исследования, описанного в примере 16. Фиг. 29А представляет собой график, демонстрирующий концентрацию тестируемого изделия (IL-15 или конъюгата 1) в плазме крови у мышей *balb/c* в течение периода времени, составляющего 144 ч после введения однократной внутривенной дозы тестируемых изделий в дозах 0,5 и 0,3 мг/кг соответственно. Конъюгат 1 характеризуется периодом полувыведения, составляющим примерно 12 ч, тогда как IL-15 быстро выводится из плазмы крови, характеризуясь периодом полувыведения, составляющим менее 1 ч. Фиг. 29В представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении pSTAT5 в CD8 Т-клетках у мышей после однократной инъекции конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг. Конъюгат 1 при обоих уровнях дозы индуцирует устойчивую передачу сигнала pSTAT5 в CD8 Т-клетках. Показан 120-часовой период времени, включая момент перед введением дозы. Фиг. 29С представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении pSTAT5 в NK-клетках мыши после однократной инъекции конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг. Конъюгат 1 при обоих уровнях дозы индуцирует сильную и устойчивую передачу сигнала pSTAT5 в NK-клетках.

Фиг. 30А-С представляют собой графики, демонстрирующие суммарные количества CD8 Т-клеток, центральных CD8 Т-клеток памяти (T_{cm}) и эффекторных CD8 Т-клеток памяти (T_{em}) соответственно, после однократного введения конъюгата 1 в дозах 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 1,5 мг/кг, как описано в примере 17. Конъюгат 1 при уровнях дозы, равных или превышающих 0,03, индуцирует значительное увеличение суммарного количества CD8 Т-клеток в крови, как описано в примере 17. Самая низкая доза 0,01 мг/кг повышала уровни CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} . В дозе 0,3 мг/кг конъюгат 1 обеспечивал увеличение количества CD8 Т-клеток, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} в 6,4 раза, 37,9 раз и 14,5 раз соответственно. Следует отметить, что количества CD8 Т-клеток и CD8 Т-клеток памяти не возвращаются к исходному уровню через 240 ч после инъекции при введении конъюгата 1 в дозе 0,3-1,5 мг/кг, что демонстрирует устойчивые PD эффекты конъюгата 1.

Фиг. 30D, 30E и 30F представляют собой графики, демонстрирующие процент положительности в отношении Ki-67 в суммарных популяциях CD8 Т-клеток, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} соответственно у мышей, как описано в примере 17. Однократная доза конъюгата 1 при всех уровнях дозы обеспечивает увеличение положительности в отношении Ki-67 во всех CD8 Т-клетках и субпопуляциях CD8 Т-клеток.

Фиг. 31А, 31В и 31С представляют собой графики, демонстрирующие количества CD8 Т-клеток и субпопуляции CD8 Т-клеток памяти после введения конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг однократно (точные линии) или $Q7dx3$ (сплошные линии), как описано в примере 17. Повторное введение дозы еще больше увеличивало численность данных популяций с увеличением CD8, CD8 T_{cm} , CD8 T_{em} в 35,3 раза, 183 раза и 73,8 раза соответственно. В конце данного периода времени (через 240 ч после первой или последней дозы 0,3 мг/кг) количества клеток не возвращались к исходному уровню у мышей.

Фиг. 32А и 32В представляют собой графики, демонстрирующие количества NK-клеток и процент положительности в отношении Ki-67 у мышей после введения однократной дозы конъюгата 1, составляющей от 0,01 до 1,5 мг/кг, как описано в примере 17. Количество NK-клеток значительно превышало количества в случае применения контроля, представляющего собой среду-носитель, при всех уровнях дозы и возвращались к исходному уровню через 240 ч после введения дозы. Все уровни дозы индуцируют устойчивое увеличение процента положительности в отношении Ki-67 в NK-клетках.

Фиг. 32С представляет собой график, демонстрирующий количества NK-клеток мыши после однократного (сплошные линии) или $Q7dx3$ (пунктирные линии) введения конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг, как описано в примере 17. Повторное введение дозы конъюгата 1, составляющей 0,3 мг/кг, индуцировало немного меньшие, хотя по-прежнему значимые, количества NK-клеток по сравнению с однократной дозой. Подобные количества NK-клеток достигали при однократном введении дозы по сравнению с повторным введением дозы, составляющей 0,03 мг/кг.

На фиг. 33А проиллюстрирован анализ цитотоксичности NK-клеток *in vitro*, при котором измеряют изменения в опосредованном NK-клетками лизисе целевых клеток после обработки тестируемым изделием у мышей, как описано в примере 18. Показан процент специфического лизиса клеток YAC-1 NK-клетками селезенки, выделенными у мышей *balb/c*, обработанных 0,006, 0,03 или 0,3 мг/кг конъюгата 1 или 1 мг/кг IL-15, в указанные часы в течение периода времени. NK-клетки селезенки от мышей, которым вводили дозу среды-носителя, служили в качестве контроля. Конъюгат 1, введенный в дозе 0,3 мг/кг, индуцировал повышение цитотоксичности NK-клеток, превосходящее по величине и продолжительности NK-клетки от мышей, получавших однократную инъекцию IL-15 в дозе 1 мг/кг.

Фиг. 33В представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении

гранзима В в НК-клетках крови от тех же мышей, используемых в анализе цитотоксичности НК-клеток *in vitro* на фиг. 33А (См. пример 18). Конъюгат 1, введенный в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг, индуцировал значительное увеличение уровней экспрессии гранзима В в НК-клетках, при этом сильное и устойчивое повышение наблюдали в дозе 0,3 мг/кг.

На фиг. 34А и 34В проиллюстрирован процент подавления образования узлов в легких у мышей *balb/c*, получавших внутривенную инъекцию опухолевых клеток СТ-26 с последующей обработкой конъюгатом 1 при двукратном введении доз, составляющих 0,03 или 0,3 мг/кг, с интервалом в одну неделю, как описано в примере 19. Инъекция конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг подавляла образование узлов в легких на 40 и 80% соответственно. За теми же мышами, которым вводили дозу 0,3 мг/кг, вели наблюдение в течение 32 дней после инъекции опухолевых клеток для оценки выживаемости. Обработка конъюгатом 1 значительно увеличивала выживаемость по сравнению с мышами, получавшими контроль, представляющий собой среду-носитель, которым инъецировали опухолевые клетки.

Фиг. 35 представляет собой график, демонстрирующий процент подавления образования узлов в легких у мышей, которым инъецировали СТ-26 и которых обрабатывали конъюгатом 2, которые получали опосредованное истощение НК-клеток (оливково-зеленый), контроль IgG (синий) или PBS (оранжевый), как описано в примере 20. Данные представлены в виде процента подавления образования узлов в легких по сравнению с мышами, которым инъецировали СТ-26, которые не подвергали истощению по НК-клеткам и обрабатывали контролем, представляющим собой среду-носитель (черный). Эффективность конъюгата 2 в данной модели опухоли устранялась при отсутствии у мышей НК-клеток.

Фиг. 36А и 36В представляют собой графики, иллюстрирующие количества CD8 клеток и процент положительности в отношении Ki-67 в качестве меры пролиферации в течении двухнедельного периода времени у одного самца (точечная линия) и одной самки (сплошная линия) яванского макака после внутривенного введения конъюгата 1 в дозе 0,1 мг/кг, как описано в примере 21. Конъюгат 1 индуцирует значительное увеличение CD8 Т-клеток у яванского макака с 7-10-кратным увеличением количества клеток после введения однократной дозы.

На фиг. 36С и 36D проиллюстрировано увеличение количества CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} клеток у яванского макака после однократной инъекции конъюгата 1, как описано в примере 21. Количество CD8 T_{cm} и T_{em} увеличивались в 27-30 раз и 21-33 раза соответственно.

Фиг. 37А и 37В представляют собой графики, демонстрирующие количества НК-клеток и процент положительности в отношении Ki-67 у яванского макака после введения однократной дозы конъюгата 1, составляющей 0,1 мг/кг (См. пример 21). Количество НК-клеток увеличивалось в 9-10 раз после обработки конъюгатом 1.

Фиг. 38А и 38В представляют собой кривые EC50 для обработки человеческих PBMC с помощью IL-15 (красный, закрашенный кружок) по сравнению с конъюгатом 1 (зеленый, закрашенный квадрат) и последующего измерения процента положительности в отношении pSTAT5 в CD8 и CD56bright НК-клетках, как описано в примере 22. Конъюгат 1 является в 5,5 и 15 раз менее эффективным, чем IL-15 в отношении активации CD8 и CD56bright НК-клеток соответственно. Однако в случае конъюгата 1 достигается такой же максимальный ответ, как и в случае традиционного IL-15.

Фиг. 39 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию IL-15, введенного в дозе 500 мкг/кг (зеленый, закрашенные кружки), или конъюгата 1, введенного в дозе 10 мкг/кг (розовый, закрашенные квадраты), 30 мкг/кг (фиолетовый, закрашенные треугольники вершиной вверх), 100 мкг/кг (красный, закрашенные треугольники вершиной вниз), 300 мкг/кг (оранжевый, закрашенные ромбы) или 1000 мкг/кг (темно-красный, незакрашенные шестиугольники), в плазме крови со временем после введения однократной внутривенной дозы у мышей, как описано в примере 23.

Фиг. 40 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию конъюгата 1, введенного в дозе 10 мкг/кг (розовый, закрашенные квадраты), 75 мкг/кг (фиолетовый, закрашенные треугольники вершиной вверх) или 150 мкг/кг (оранжевый, закрашенные треугольники вершиной вниз), в плазме крови со временем после введения однократной внутривенной дозы у крыс, как описано в примере 24.

Фиг. 41 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию IL-15, введенного в дозе 50 мкг/кг (зеленый, закрашенные кружки), или конъюгата 1, введенного в дозе 10 мкг/кг (красный, закрашенные треугольники вершиной вниз), 50 мкг/кг (синий, закрашенные ромбы) или 100 мкг/кг (оранжевый, закрашенные квадраты), в плазме крови со временем после введения однократной внутривенной дозы тестируемого изделия у яванских макаков, как описано в примере 25.

Фиг. 42А и 42В представляют собой графики, демонстрирующие количества CD4 Т-клеток и процент положительности в отношении Ki-67 соответственно, после введения однократной дозы конъюгата 1, составляющей 0,03 мг/кг (синий, закрашенные кружки) или 0,3 мг/кг (оранжевый, закрашенные кружки), у мышей, как описано в примере 26. Также показаны уровни клеток в случае применения среды-носителя (черный) и перед введением дозы (незакрашенные кружки). При всех уровнях дозы возвращение к исходному уровню происходило через 240 ч после введения дозы. Уровень дозы 0,3 мг/кг индуцировал устойчивое увеличение процента положительности в отношении Ki-67 в CD4 Т-клетках.

Фиг. 43 представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении pSTAT5 в CD4 Т-клетках у мышей после однократной инъекции конъюгата 1 в дозе 0,03 мг/кг (оранже-

вый, окрашенные кружки) или 0,3 мг/кг (синий, окрашенные квадраты), как описано в примере 26. Конъюгат 1 при обоих уровнях дозы индуцировал увеличенную передачу сигнала pSTAT5 в CD4 Т-клетках, при этом 0,3 мг/кг индуцировала более высокое увеличение. Показан 120-часовой период времени, включая среду-носитель (черный) и момент перед введением дозы (неокрашенные кружки).

Фиг. 44А, 44В и 44С представляют собой графики, иллюстрирующие количества клеток в зависимости от времени после введения для NK-клеток (фиг. 44А), CD8 Т-клеток (фиг. 44В) и CD4 Т-клеток (фиг. 44С) у яванских макаков после i.v. введения среды-носителя (черный) или конъюгата 1 в дозах, составляющих 0,003 мг/кг (синий, окрашенные треугольники вершиной вниз), 0,01 мг/кг (зеленый, ромбы) или 0,1 мг/кг (оранжевый, окрашенные квадраты), как описано в примере 27.

Фиг. 45А, 45В и 45С представляют собой графики, иллюстрирующие процент положительности в отношении Ki-67 после введения однократной дозы конъюгата 1, составляющей 0,001 мг/кг (фиолетовый, окрашенные квадраты), 0,003 мг/кг (синий, окрашенные треугольники вершиной вниз) или 0,1 мг/кг (оранжевый, окрашенные квадраты), у яванских макаков, как описано в примере 27. Также показаны уровни в случае применения среды-носителя (черный). При всех уровнях дозы возвращение к исходному уровню происходило через по меньшей мере 17 дней после введения дозы. Уровни дозы 0,1 мг/кг и 0,003 мг/кг индуцировали устойчивое увеличение процента положительности в отношении Ki-67 в NK-клетках и CD8 Т-клетках. Уровень дозы 0,1 мг/кг индуцировал увеличение процента положительности в отношении Ki-67 во всех тестируемых типах клеток.

На фиг. 46А, 46В и 46С проиллюстрирована степень фосфорилирования STAT5 в таких лимфоцитах, как NK-клетки (фиг. 46А), CD8 Т-клетки (фиг. 46В) и CD4 Т-клетки (фиг. 46С), после введения однократной i.v. дозы среды-носителя (черный) либо 0,001 мг/кг (фиолетовый, окрашенные квадраты), 0,01 мг/кг (зеленый, ромбы) или 0,1 мг/кг (оранжевый, окрашенные квадраты) конъюгата 1 у яванских макаков, как описано в примере 27.

Фиг. 47А-Д представляют собой графики, иллюстрирующие процент положительности в отношении Ki-67 после введения однократной дозы конъюгата 1, составляющей 0,001 мг/кг (фиолетовый, окрашенные квадраты), 0,01 мг/кг (зеленый, ромбы) или 0,1 мг/кг (оранжевый, окрашенные квадраты), у яванских макаков, как описано в примере 27. Также показаны уровни в случае применения среды-носителя (черный). На фиг. 47А показаны результаты для необученных CD8 Т-клеток, на фиг. 47В показаны результаты для CD8 T_{scm}-клеток. На фиг. 47С показаны результаты для CD8 T_{cm}-клеток. На фиг. 47Д показаны результаты для CD8 T_{em}-клеток.

Фиг. 48А, 48В и 48С представляют собой графики, иллюстрирующие уровень экспрессии гранзима В в зависимости от времени после обработки конъюгатом 1 в дозах, составляющих 0,001 мг/кг (фиг. 48А), 0,01 мг/кг (фиг. 48В) и 0,1 мг/кг (фиг. 48С), как описано в примере 28. Эти данные указывают на то, что обработка конъюгатом 1 обеспечивает увеличение уровней гранзима В в NK-клетках у отличных от человека приматов (NHP).

Фиг. 49А, 49В и 49С представляют собой графики, иллюстрирующие уровень экспрессии перфорина в зависимости от времени после обработки конъюгатом 1 в дозах, составляющих 0,001 мг/кг (фиг. 49А), 0,01 мг/кг (фиг. 49В) и 0,1 мг/кг (фиг. 49С), как описано в примере 28. Эти данные указывают на то, что обработка конъюгатом 1 обеспечивает увеличение уровней перфорина в NK-клетках у NHP.

Подробное описание

Перед подробным описанием одного или нескольких аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения следует отметить, что представленное раскрытие не предназначено для ограничения конкретными методиками синтеза, фрагментами, представляющими собой IL-15, и т.п., так как они могут варьировать, как будет понятно обычному специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

При описании и заявлении определенных признаков настоящего изобретения будет использована следующая терминология в соответствии с определениями, описанными ниже, если не указано иное.

Следует отметить, что применяемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа предусматривают множественное число, если контекст явно не указывает на иное.

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

"Физиологически расщепляемая", или "гидролизуемая", или "разрушаемая" связь представляет собой относительно нестабильную связь, которая вступает в реакцию с водой (т.е. гидролизуется) в физиологических условиях. Свойство связи гидролизироваться в воде может зависеть не только от общего типа связи, соединяющей два атома в данной молекуле, но также от заместителей, присоединенных к указанным атомам. Соответствующие гидролитически неустойчивые или слабые связи включают без ограничения связи в сложном эфире карбоновой кислоты, сложном эфире фосфорной кислоты, ангидридах, ацеталах, кеталах, простом ацилоксиалкиловом эфире, имидах, сложных ортоэфирах, пептидах, олигонуклеотидах, сложных тиоэфирах и карбонатах.

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

"Стабильные" связывание или связь относятся к химической связи, которая по сути стабильна в воде, т.е. не подвергается гидролизу в физиологических условиях до какой-либо заметной степени в течение длительного периода времени. Примеры гидролитически стабильных связей, как правило, включают без ограничения следующие: углерод-углеродные связи (например, в алифатических цепях), связи в простых эфирах, амидах, аминах и т.п. Как правило, стабильная связь представляет собой такую, которая характеризуется степенью гидролиза в физиологических условиях, составляющей менее приблизительно 1-2% в день. Значения степени гидролиза иллюстративных химических связей можно найти в большинстве справочников по химии.

Ковалентная "обеспечивающая высвобождение" связь, например, в контексте полиэтиленгликоля, который ковалентно присоединен к активному фрагменту, такому как интерлейкин-15, представляет собой связь, которая обеспечивает высвобождение или отделение полимера полиэтиленгликоля от активного фрагмента в физиологических условиях, например, посредством любого подходящего механизма, со скоростью, которая является клинически применимой, и включает, например, и без ограничения гидролизуемые связи и ферментативно разрушаемые связи.

"По сути" или "по существу" означает почти полностью или полностью, например, 95% или больше от указанного количества.

Подобным образом, "приблизительно" или "примерно", как используется в данном документе, означает в пределах плюс или минус 5% от указанного количества.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описываемое далее обстоятельство может, но необязательно, иметь место, поэтому описание включает случаи, когда обстоятельство имеет место, и случаи, когда оно не имеет места.

"Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" или "фармацевтически приемлемый носитель" относится к компоненту, который может быть включен в композицию, описанную в данном документе, и не вызывает значительных неблагоприятных токсических эффектов у субъекта.

Фразы "фармацевтически эффективное количество" и "фармакологически эффективное количество", а также "терапевтически эффективное количество" и "физиологически эффективное количество" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству длительно действующего агониста IL-15-R, представленного в данном документе, которое необходимо для обеспечения требуемого уровня вещества в кровотоке или в целевой ткани для обеспечения требуемого биологического или медицинского ответа. Например, таким ответом может быть разрушение целевых раковых клеток или замедление или задержка прогрессирования рака у субъекта. Данный термин также применяется к дозе, которая будет индуцировать конкретный ответ в целевых клетках. Точное количество будет зависеть от ряда факторов, таких как, например, конкретное состояние, подлежащее лечению, предполагаемая популяция пациентов, особенности отдельного пациента, компоненты и физические характеристики терапевтической композиции, подлежащей введению, и т.п.

Упоминание длительно действующего агониста IL-15-R, описанного в данном документе, подразумевает как охватывающее его фармацевтически приемлемые солевые формы.

Термин "пациент" или "субъект", используемый в данном документе, относится к живому организму, страдающему состоянием или подверженному ему, которое можно предупреждать или лечить путем введения соединения или композиции, представленных в данном документе. Субъекты включают без ограничения млекопитающих (например, представителей семейств мышинных, обезьяньих, лошадиных, бычьих, свиных, собачьих, кошачьих и т.п.) и предпочтительно представляют собой людей.

Молекулярная масса в контексте водорастворимого полимера, такого как PEG, может выражаться либо как среднечисловая молекулярная масса, либо как средневесовая молекулярная масса. Если не указано иное, все ссылки на молекулярную массу в данном документе относятся к средневесовой молекулярной массе. Оба определения молекулярной массы, среднечисловой и средневесовой, могут измеряться с применением гельпроникающей хроматографии или других методик жидкостной хроматографии (например, гельфильтрационной хроматографии). Наиболее часто используемой является гельпроникающая хроматография и гельфильтрационная хроматография. Другие способы определения молекулярной массы включают анализ 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, MALDI TOF или вискозиметрии для определения средневесовой молекулярной массы. Полимеры PEG, как правило, являются полидисперсными (т.е. среднечисловая молекулярная масса и средневесовая молекулярная масса полимеров не равны), обладают низкими значениями полидисперсности, составляющими предпочтительно менее приблизительно 1,2, более предпочтительно менее приблизительно 1,15, еще более предпочтительно менее приблизительно 1,10, еще более предпочтительно менее приблизительно 1,05 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 1,03.

Термины "активный", "реакционноспособный" или "активированный" при применении в сочетании с конкретной функциональной группой относятся к реакционноспособной функциональной группе, которая легко вступает в реакцию с электрофилом или нуклеофилом на другой молекуле. Это отличает их от групп, для которых необходимы сильные катализаторы или весьма трудно реализуемые условия реак-

ции, чтобы вступить в реакцию (т.е. "нереакционноспособная" или "инертная" группа).

Используемый в данном документе термин "функциональная группа" или его любой синоним подразумеваются как охватывающие ее формы с защитной группой, а также формы без защитной группы.

Термины "спейсерный фрагмент", "связь" и "линкер" могут использоваться в данном документе для обозначения связи, или атома, или совокупности атомов, необязательно применяемых для связывания взаимосоединяющихся фрагментов, таких как конец полимерного реагента и фрагмент, представляющий собой IL-15. Спейсерный фрагмент может быть гидролитически стабильным или может включать физиологически гидролизуемую, ферментативно разрушаемую связь или связь, обеспечивающую высвобождение иным образом. Если в контексте явно не указано иное, спейсерный фрагмент необязательно находится между любыми двумя элементами соединения (например, фрагмент, представляющий собой IL-15, и водорастворимый полимер, такой как PEG, могут быть присоединены непосредственно или опосредованно с помощью спейсерного фрагмента).

"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, 3-метилпентил и т.п.

"Низший алкил" относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода, и она может являться прямоцепочечной или разветвленной, примером которой является метил, этил, н-бутил, изобутил и трет-бутил.

"Алкокси" относится к группе -OR, где R представляет собой алкил или замещенный алкил, предпочтительно C₁₋₆алкил (например, метокси, этокси, пропилокси и т.д.).

Термин "замещенный", например, как в "замещенном алкиле", относится к фрагменту (например, алкильной группе), замещенному одним или несколькими не оказывающими взаимного влияния заместителями, такими как без ограничения алкил, C₃₋₈циклоалкил, 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, содержащий одну или несколько не оказывающих взаимного влияния групп в качестве заместителя. Что касается замещений на фенильном кольце, заместители могут находиться в любом положении (т.е. орто, мета или пара).

"Не оказывающие взаимного влияния заместители" представляют собой группы, которые, если присутствуют в молекуле, являются, как правило, нереакционноспособными в отношении других функциональных групп, содержащихся в молекуле.

"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 с одним или несколькими циклическими углеводородными, гетероарильными или гетероциклическими кольцами или являться неконденсированными. Как используется в данном документе, "арил" включает гетероарил.

"Гетероарил" представляет собой арильную группу, содержащую от одного до четырех гетероатомов, предпочтительно атом серы, кислорода или азота, 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 которые содержат по меньшей мере один атом в кольце, не представляющий собой атом углерода. Предпочтительные гетероатомы включают атом серы, кислорода и азота.

"Замещенный гетероарил" представляет собой гетероарил, содержащий одну или несколько не оказывающих взаимного влияния групп в качестве заместителей.

"Замещенный гетероцикл" представляет собой гетероцикл, содержащий одну или несколько боковых цепей, образованных из не оказывающих взаимного влияния заместителей.

"Органический радикал", как используется в данном документе, будет включать алкил, замещенный алкил, арил и замещенный арил.

"Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель" относится к вспомогательному веществу, которое необязательно может быть включено в композиции по настоящему изобретению и которое не вызывает значительных неблагоприятных токсических эффектов у пациента.

Термин "фрагмент, представляющий собой IL-15", используемый в данном документе, относится к пептидному или белковому фрагменту, обладающему активностью IL-15 человека. Кроме того, термин "фрагмент, представляющий собой IL-15" охватывает как фрагмент, представляющий собой IL-15, перед конъюгацией, так и остаток фрагмента, представляющего собой IL-15, после конъюгации. Как будет объясняться более подробно ниже, обычный специалист в данной области техники сможет определить, обладает ли какой-либо указанный фрагмент активностью IL-15. Белки, содержащие аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 1-3, представляют собой фрагмент, пред-

ставляющий собой IL-15, а также любой белок или полипептид, по сути гомологичный им. Используемый в данном документе термин "фрагмент, представляющий собой IL-15" включает такие пептиды и белки, которые модифицированы преднамеренно, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или случайным образом посредством мутаций. Данные термины также включают аналоги, содержащие от 1 до 6 дополнительных сайтов гликозилирования, аналоги, содержащие по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту на карбокси-конце пептида или белка, где дополнительная(ые) аминокислота(ы) включает(ют) по меньшей мере один сайт гликозилирования, и аналоги, имеющие аминокислотную последовательность, которая включает по меньшей мере один сайт гликозилирования. Данный термин включает фрагменты, полученные естественным, рекомбинантным и синтетическим способом.

Термин "по сути гомологичный" или "по сути идентичный" означает, что конкретная рассматриваемая последовательность, например, мутантная последовательность, отличается от эталонной последовательности одной или несколькими заменами, делециями или добавлениями, совокупный эффект которых не приводит в результате к неблагоприятному функциональному расхождению между эталонной и рассматриваемой последовательностями. Для целей данного документа последовательность, характеризующуюся более 95-процентной гомологией (идентичностью), эквивалентной биологической активностью (хотя не обязательно эквивалентной величиной биологической активности) и эквивалентными характеристиками экспрессии с указанной последовательностью, считают по сути гомологичной (идентичной). Для целей определения гомологии усечением зрелой последовательности следует пренебрегать. Иллюстративные полипептиды IL-15 для применения в данном документе включают последовательности, которые по сути гомологичны с SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 является почти идентичной с SEQ ID NO: 1, за исключением того, что в начале последовательности SEQ ID NO: 2 содержится метионин, который необходим для инициации трансляции в *E.coli*.

Термин "компонент" означает любой белок или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность части или компонента фрагмента, представляющего собой IL-15, и который обладает биологической активностью IL-15 или по сути обладает его биологической активностью. Компоненты включают белки или полипептиды, образуемые при протеолитическом разрушении фрагмента, представляющего собой IL-15, а также белки или полипептиды, образуемые с помощью химического синтеза посредством способов, общепринятых в данной области техники.

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

Обзор

Настоящее изобретение относится к обеспечению длительно действующего агониста рецептора IL-15. В идеале такой агонист будет обладать некоторыми преимущественными и непредвиденными признаками, такими как, например, по меньшей мере одно, если не больше, из следующих: (i) способность предоставлять устойчивую активность IL-15 путем обеспечения измеримого фармакодинамического эффекта без необходимости ежедневного введения дозы, (ii) сохранение в значительной степени связывания с α -рецептором IL-15 (т.е. по сравнению с IL-15), (iii) стимулирование активации и/или пролиферации НК-клеток и/или (iv) поддержание выживания CD8 Т-клеток и/или формирования клеток памяти и (v) обеспечение подавления роста опухоли. Неожиданно, заявители получили длительно действующий агонист IL-15-R, который обладает уникальной комбинацией преимущественных свойств, что будет описано более подробно ниже.

Длительно действующий агонист IL-15-R и связанные с ним композиции Как правило, длительно действующий агонист рецептора IL-15 или его фармацевтически приемлемая солевая форма содержат один фрагмент, представляющий собой линейный PEG (полиэтиленгликоль), стабильно ковалентно присоединенный к аминокислоте IL-15 посредством амидной связи. Между фрагментом PEG и стабильной амидной связью с аминокислотой IL-15 находится линейная незамещенная алкиленовая группа $(-CH_2)_m$, содержащая от 2 до 5 атомов углерода (т.е. $m=2, 3, 4$ или 5).

При рассмотрении фрагмента, представляющего собой IL-15, термин "фрагмент, представляющего собой IL-15" относится к фрагменту, представляющему собой IL-15, до конъюгации, а также к фрагменту, представляющему собой IL-15, после присоединения к непептидному водорастворимому полимеру, такому как поли(алкиленоксид) (например, поли(этиленгликоль) или PEG). Хотя ниже приводится конкретная ссылка на PEG в качестве непептидного водорастворимого полимера, следует понимать, что настоящее изобретение в целом относится к непептидному водорастворимому полимеру или поли(алкиленгликолю). Однако будет понятно, что если исходный фрагмент, представляющий собой IL-15, присоединен к полиэтиленгликолевому фрагменту, то фрагмента, представляющего собой IL-15, немного

меняется из-за присутствия одной или нескольких ковалентных связей, обусловленных связыванием с полимером(и).

Фрагмент, представляющий собой IL-15, можно получать рекомбинантными способами и рекомбинантными способами, и настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть получен из человеческих источников, животных источников (в том числе насекомых), грибковых источников (в том числе дрожжей) и растительных источников.

Фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть получен согласно процедурам, описанным, например, Grabstein et al. [см. Grabstein et al. (1994) *Science* 264:965-968]. Фрагмент, представляющий собой IL-15, также может быть получен с применением рекомбинантных способов, таких как, например, раскрытые в европейском патенте № 0772624 B2, принадлежащем Immunex Corporation. В качестве альтернативы фрагмент, представляющий собой IL-15, можно коммерчески приобрести, например, у GenScript USA Inc. (Пискатауэй, Нью-Джерси) и Reprotech (Роки-Хилл, Нью-Джерси).

Фрагмент, представляющий собой IL-15, может экспрессироваться в системе экспрессии на основе клеток бактерий [например, *E. coli*, см., например, Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. Biotechnol.* 21(3):295-311], млекопитающих [см., например, Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304], дрожжей [например, *Pichia pastoris*, см., например, Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1): 121-129] и растений [см., например, Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266]. Экспрессия может происходить в виде экзогенной экспрессии (когда клетка-хозяин по своей природе содержит требуемые элементы для генетического кодирования) или в виде эндогенной экспрессии.

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

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, с получением таким образом слитого белка, состоящего из требуемого полипептида и полипептида, пригодного для связывания. Слитые белки можно идентифицировать и очищать с помощью, прежде всего, прогона смеси, содержащей слитый белок, через колонку для аффинной хроматографии, несущую фрагменты связывания (например, антитела), направленные на эпитопную метку или другую последовательность для связывания в слитых белках, с обеспечением таким образом связывания слитого белка с колонкой. После этого слитый белок можно выделить посредством промывки колонки подходящим раствором (например, кислотой) для высвобождения связанного слитого белка. Рекомбинантный полипептид также можно очищать посредством лизирования клеток-хозяев, отделения полипептида, например, с помощью ионообменной хроматографии, подходов, основанных на аффинном связывании, подходов, основанных на гидрофобном взаимодействии, и, после этого идентифицирования с помощью MALDI или вестерн-блоттинга и сбора полипептида. Эти и другие способы идентификации и очистки рекомбинантных полипептидов известны обычным специалистам в данной области техники. Однако в одном или нескольких вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой IL-15, не находится в форме слитого белка.

В зависимости от системы, применяемой для экспрессии белков, обладающих активностью IL-15, фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть негликозилированным или гликозилированным, и любой из них может применяться. Иными словами, фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть негликозилированным, или фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть гликозилированным. В одном или нескольких вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой IL-15, является негликозилированным.

Фрагмент, представляющий собой IL-15, преимущественно можно модифицировать с включением и/или заменой 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 замены в фрагменте, представляющем собой IL-15, описан в патенте США № 6177079. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением не встречающегося в природе аминокислотного остатка. Методики добавления аминокислотных остатков и не встречающихся в природе аминокислотных остатков хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. Ссылка сделана на J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992) и *Bioinformatics for Geneticists* (eds. Michael R. Barnes and Ian C Gray), 2003 John Wiley & Sons, Ltd, Chapter 14, *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*, Betts, M.J., and Russell, R.B.

Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, преимущественно можно модифицировать с включением точки прикрепления функциональной группы (иным образом, чем посредством добавления аминокислотного остатка, содержащего функциональную группу). Например, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением тиольной группы. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением N-концевого альфа-углерода. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением одного или нескольких углеводных фрагментов. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением альдегидной группы. Кроме того, фрагмент, представляющий собой IL-15, можно модифицировать с включением кетонной группы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы фрагмент, представляющий собой IL-15, не являлся модифицированным с включением одной или нескольких тиольных групп, N-концевого альфа-углерода, углевода, альдегидной группы и кетонной группы.

Иллюстративные фрагменты, представляющие собой IL-15, описаны в данном документе, в литературе и, например, в публикации заявки на патент США № 2006/0104945, Pettit et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(4):2312-2318 и Wong et al. (2013) *OncolImmunology* 2(11), e26442:1-3. Предпочтительные фрагменты, представляющие собой IL-15, включают такие с аминокислотной последовательностью, включающей последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 и последовательностей, по сути гомологичных им (где даже если SEQ ID NO: 2 и 3 и последовательности, по сути гомологичные им, не соответствуют стандарту активности *in vitro* фрагмента, представляющего собой IL-15, представленного в данном документе, для целей настоящего изобретения будет понятно, что данные последовательности также рассматриваются как "фрагменты, представляющие собой IL-15"). Предпочтительный фрагмент, представляющий собой IL-15, имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой IL-15, является функциональным гомологом, характеризующимся по меньшей мере приблизительно 85% или по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой IL-15, является функциональным гомологом, характеризующимся по меньшей мере приблизительно 95, 98 или 99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-3.

В некоторых случаях фрагмент, представляющий собой IL-15, будет находиться в "мономерной" форме, где один продукт экспрессии соответствующего пептида организован в дискретную единицу. В других случаях фрагмент, представляющий собой IL-15, будет находиться в форме "димера" (например, димера рекомбинантного IL-15), где две мономерные формы белка связаны друг с другом.

Кроме того, в качестве фрагмента, представляющего собой IL-15, могут применяться формы-предшественники IL-15. Иллюстративная форма-предшественник IL-15 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

Усеченные версии, гибридные варианты и пептидные миметики любой из вышеуказанных последовательностей также могут служить в качестве фрагмента, представляющего собой IL-15. Биологически активные компоненты, варианты с делецией, варианты с замещением или варианты с добавлением любого из вышеуказанного, которые сохраняют по меньшей мере некоторую степень активности IL-15, также могут служить в качестве фрагмента, представляющего собой IL-15.

Для любого указанного пептида или белкового фрагмента или конъюгата можно определить, имеет ли данный пептид или белковый фрагмент или конъюгат активность IL-15. Различные способы определения активности IL-15 *in vitro* описаны в уровне техники. Типичный подход основан на анализе pSTAT. Вкратце, если IL-15-зависимую клетку CTLL-2 подвергнуть воздействию тестируемого изделия, обладающего активностью IL-15, то происходит иницирование сигнального каскада, который включает фосфорилирование STAT5 по остатку тирозина 694 (Tyr694), которое можно количественно измерить. Протоколы и наборы для анализа известны и включают, например, набор MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa, b Whole Cell Lysate Kit (Meso Scal Diagnostics, LLC, Гейтерсберг, Мэриленд). Например, при использовании этого подхода предложенный фрагмент, представляющий собой IL-15, который демонстрирует значение EC50 pSTAT5 не более приблизительно 300 нг/мл (более предпочтительно не более приблизительно 150 нг/мл) по меньшей мере в течение 5 или 10 мин, считают "фрагментом, представляющим собой IL-15" в соответствии с настоящим раскрытием. Однако предпочтительно, чтобы используемый фрагмент, представляющий собой IL-15, был более эффективным (например, со значением EC50 pSTAT5 менее 150 нг/мл по меньшей мере в течение 5 или 10 мин, как например менее приблизительно 1 нг/мл, и еще более предпочтительно менее 0,5 нг/мл по меньшей мере в течение 5 или 10 мин).

Другие методики, известные в уровне техники, также можно применять для оценки функции IL-15, в том числе электрометрические, спектрофотометрические, хроматографические и радиометрические методики. См., например, Ring et al. (2012) *Nat. Immunol.* 13(12): 1187-1195 для одного такого дополнительного типа анализа.

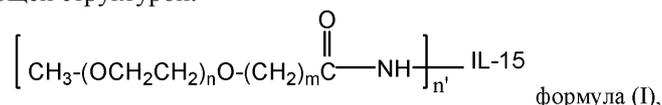
Анализы для использования в связи с измерением активности фрагмента, представляющего собой IL-15, также можно применять для измерения активности длительно действующих агонистов IL-15-R, описанных в данном документе. См., например, вспомогательные примеры, представленные в данном документе.

В соответствии с настоящим раскрытием соединение считается длительно действующим агонистом IL-15-R при условии, что после введения субъекту агонист проявляет агонизм в отношении IL-15 in vivo в течение периода времени, превышающего таковой в случае введения IL-15. Традиционные подходы, такие как введение радиоактивной метки в соединение, введение соединения in vivo и определение его клиренса, могут быть использованы для оценки того, является ли соединение, предложенное как длительно действующий агонист IL-15-R, "длительно действующим" (т.е. имеет клиренс, который дольше такового у IL-15, вводимого в той же системе in vivo). Для целей настоящего документа характер длительного действия длительно действующего агониста IL-15-R можно определять и обычно определяют с помощью проточной цитометрии для измерения фосфорилирования STAT5 в лимфоцитах в различные моменты времени после введения агониста, подлежащего оцениванию, у мышей. В качестве индикатора служит то, что сигнал теряется к приблизительно 24 ч в случае IL-15, но является устойчивым на протяжении периода, превышающего таковой для длительно действующего агониста IL-15.

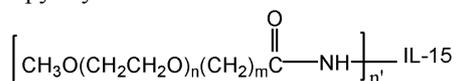
Как обсуждалось ранее, предпочтительный длительно действующий агонист IL-15-R, как правило, будет включать один линейный фрагмент PEG (полиэтиленгликоля), стабильно ковалентно присоединенный к аминогруппе IL-15 посредством амидной связи. Между фрагментом PEG и стабильной амидной связью с аминогруппой IL-15 находится линейная незамещенная алкиленовая группа $(-CH_2)_m$, имеющая от 2 до 5 атомов углерода (т.е. где $m=2, 3, 4$ или 5).

Например, в некоторых вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_2$; или в некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_3$; еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_4$; в еще некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(-CH_2)_5$.

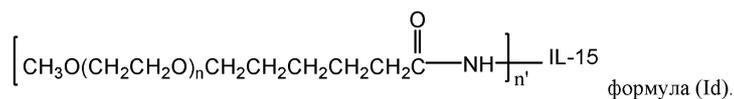
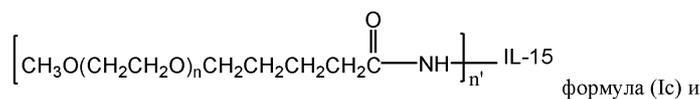
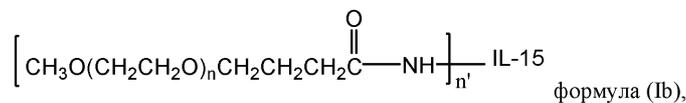
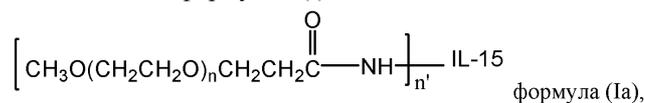
Например, в некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется следующей структурой:



где IL-15 представляет собой фрагмент, представляющий собой интерлейкин-15, n представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000; m представляет собой целое число от 2 до 5 (например, 2, 3, 4 или 5) и n' равняется 1. В формуле I (и в подобных формулах, представленных в данном документе) $-NH-$ в структуре представляет собой аминогруппу фрагмента, представляющего собой IL-15. Формула (I) также может быть изображена следующим образом, где скобки сдвинуты, чтобы отобразить концевую метоксигруппу PEG



и эти две формулы могут использоваться взаимозаменяемо. Иллюстративные типичные соединения включают следующие, охватываемые формулой (I):



В некоторых предпочтительных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 соответствует формуле (Ia) или формуле (Ib). В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 соответствует формуле (Ib).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления в отношении структур и формул, описываемых в данном документе, n представляет собой целое число от приблизительно 200 до приблизительно 2000, или от приблизительно 400 до приблизительно 1300, или от приблизительно 450 до приблизительно 1200. То есть, в некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 200 до приблизительно 2000. В некоторых дополнительных вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 400 до приблизительно 1300. В некоторых дополни-

тельных вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 450 до приблизительно 1200.

PEG с молекулярной массой, соответствующей любому из упомянутых выше диапазонов значений n , как правило, являются предпочтительными.

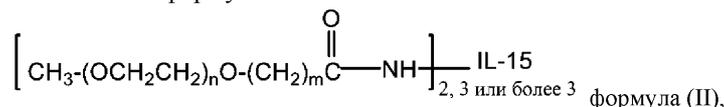
В одном или нескольких вариантах осуществления n представляет собой целое число, имеющее значение, которое соответствует полиэтиленгликолевому полимеру со средневесовой молекулярной массой, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 10000 дальтон (где n равняется ~227), или приблизительно 15000 дальтон (где n равняется ~340), или приблизительно 20000 дальтон (где n равняется ~454), или приблизительно 25000 дальтон (где n равняется ~568), или приблизительно 30000 дальтон (где n равняется ~681), или приблизительно 40000 дальтон (где n равняется ~909), или приблизительно 50000 дальтон (где n равняется ~1136) или даже приблизительно 60000 дальтон (где n равняется ~1364) или больше.

Следующие типичные средневесовые молекулярные массы для полиэтиленгликолевой части соединения, в дополнение к упомянутым выше, включают приблизительно 11000 дальтон, приблизительно 12000 дальтон, приблизительно 13000 дальтон, приблизительно 14000 дальтон, приблизительно 22500 дальтон, приблизительно 35000 дальтон, приблизительно 45000 дальтон, приблизительно 55000 дальтон, приблизительно 65000 дальтон, приблизительно 70000 дальтон и приблизительно 75000 дальтон.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса полиэтиленгликолевой полимерной части соединения составляет приблизительно 40000 дальтон.

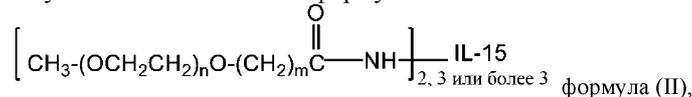
Тогда как фрагмент PEG предпочтительно заблокирован на конце с помощью метоксигруппы, как показано выше в формуле (I), фрагмент PEG может быть заблокирован на своем конце любой низшей C_1 -алкоксигруппой, или может оканчиваться гидроксильной группой или другой подходящей блокирующей конец группой.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 20 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



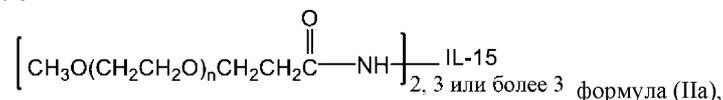
при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I). То есть, что касается компонента длительно действующего агониста рецептора IL-15 таких композиций, не более приблизительно 20 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, содержащихся в композиции, характеризуются формулой (II).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I). То есть, что касается компонента таких композиций, представляющего собой длительно действующий агонист рецептора IL-15, не более приблизительно 15 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, содержащихся в композиции, характеризуются формулой (II). В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 0,1-20 мол.% соединений формулы (II). В вариантах осуществления композиции включают не более приблизительно 0,1-15, 0,1-10, 0,1-5, 0,1-1, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 мол.% соединений формулы (II).

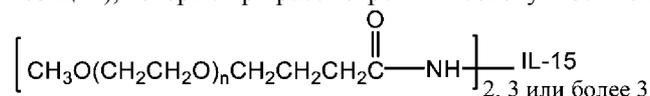
В некоторых конкретных вариантах осуществления, касающихся упомянутого выше, композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15, характеризующегося формулой (Ia), содержит не более приблизительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Ia).

В некоторых других предпочтительных вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15, характеризующегося формулой (Ib), содержит не более прибли-

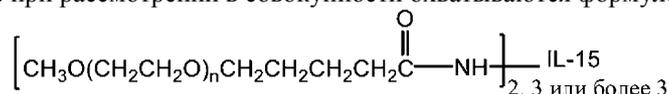
зительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой:



формула (IIb),

при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Ib).

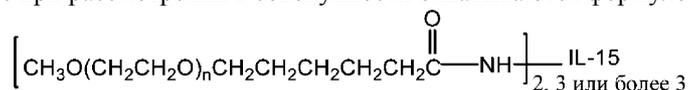
В некоторых других вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15, характеризующегося формулой (Ic), содержит не более приблизительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой:



формула (IIc),

при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Ic).

В некоторых других вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15, характеризующегося формулой (Id), содержит не более приблизительно 15 мольных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой:



формула (IId),

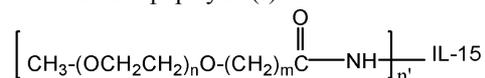
при этом значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Id).

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 0,1-20 мол.% соединений формулы (II), в том числе соединений формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId). В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиции включают не более приблизительно 0,1-15, 0,1-10, 0,1-5, 0,1-1, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 мол.% соединений формулы (II), в том числе соединений формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId). В некоторых вариантах осуществления композиции включают не более приблизительно 0,1, 1, 5, 10, 15 или 20 мол.% соединений формулы (II), в том числе соединений формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId). Следует учитывать, что композиции могут быть очищены способами, известными в уровне техники, для соединений формулы (I), что приводит к отсутствию, следовым количествам или по существу отсутствию соединений формулы (II) в композиции.

Например, в некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 12 мольных процентов или не более приблизительно 10 мольных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15, которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой (II), в том числе соединения формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного композиция содержит не более приблизительно 7 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15, характеризующихся n' , равным 2, 3 или более 3 (т.е. полимеры с более высоким количеством звеньев PEG). В некоторых других вариантах осуществления композиция содержит не более приблизительно 5 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15, характеризующихся n' , равным 2, 3 или более 3 (т.е. 2 или больше).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция содержит длительно действующий агонист рецептора IL-15 согласно формуле (I)



где n и m описаны выше, и n' представляет собой среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов, ковалентно присоединенных к аминогруппам IL-15 (для композиции), и n' для композиции находится в диапазоне от 1,0 до приблизительно 1,3. Например, среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов на фрагмент, представляющий собой IL-15, выбрано из приблизительно 1,0, 1,1, 1,2 и приблизительно 1,3. То есть предпочтительный длительно действующий агонист рецептора IL-15 согласно формуле (I) может упоминаться в данном документе как "монопегилированный", причем это следует понимать как то, что существует некоторая вариативность в отношении степени пегилирования, как описано выше. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в отношении формул, описываемых в данном доку-

менте, "m" равняется 3.

Композиция на основе длительно действующего агониста IL-15-R может содержать один тип молекул, где n' равняется приблизительно 1, а фрагмент PEG присоединен в одинаковом положении, что характерно для по существу всех конъюгатов IL-15 в композиции, или, в качестве альтернативы, может содержать смесь монопегилированных молекул конъюгатов, где присоединение линейного полиэтиленгликолевого фрагмента происходит в разных участках фрагмента, представляющего собой интерлейкин-15, то есть где конкретные участки присоединения не являются одинаковыми для всех монопегилированных молекул IL-15, содержащихся в композиции. Таким образом, такие композиции по существу являются гомогенными в отношении количества фрагментов PEG, присоединенных к IL-15 (например, 1-меры), но являются гетерогенными в отношении положений присоединения к аминокгруппе в молекуле IL-15.

В то время как для получения длительно действующего агониста IL-15-R могут использоваться дополнительные архитектуры PEG и химические связи, соединения, такие как описанные ранее, являются предпочтительными в одном или нескольких вариантах осуществления, что станет очевидным при рассмотрении вспомогательных примеров. Однако также рассматриваются дополнительные длительно действующие агонисты IL-15-R, характеризующиеся структурами, представленными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит по меньшей мере приблизительно 80 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), охватываемых, при рассмотрении в совокупности, формулой (I), в том числе формулами (Ia-d). В одном или нескольких вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит по меньшей мере приблизительно 85 мол.%, 90 мол.%, 95 мол.%, 98 мол.% или 99 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15 формулы (I).

Как описано выше, длительно действующий агонист IL-15-R может находиться в виде фармацевтически приемлемой соли. Как правило, такие соли образуются путем проведения реакции с фармацевтически приемлемой кислотой или эквивалентом кислоты. Термин "фармацевтически приемлемая соль" в этом отношении, как правило, будет относиться к относительно нетоксическим солям присоединения неорганической и органической кислоты. Эти соли могут быть получены *in situ* в среде-носителе для введения, или в ходе изготовления лекарственной формы, или путем отдельного проведения реакции длительно действующего агониста рецептора интерлейкина-15, описанного в данном документе, с подходящей органической или неорганической кислотой и выделения образованной таким образом соли. Типичные соли включают соли, представляющие собой гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтиллат, оксилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т.п. (См., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19). Таким образом, описанные соли могут быть получены из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п.; или получены из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилацетатная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изотионовая и т.п.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более приблизительно 1-5 мол.% свободного белка IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции) при рассмотрении в совокупности. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста IL-15 содержит не более приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 мол.% свободного (т.е. неконъюгированного) IL-15.

Для получения длительно действующего агониста рецептора IL-15 фрагмент, представляющий собой IL-15, например, может быть конъюгирован по своим аминокгруппам (например, остаткам лизина или N-концу) с реагентом PEG, функционализированным сукцинимидильной группой (или другой сложноэфирной активированной группой). С использованием данного подхода активированный сукцинимидилом PEG может быть присоединен к аминокгруппам на фрагменте, представляющем собой IL-15, в водной среде при pH от приблизительно 7,0 до 9,0, хотя с использованием других условий реакции (например, более низкого pH, такого как 6-7 или 7-8, или других температур и/или менее 15°C) можно в результате получить присоединение фрагмента PEG в другом положении на фрагменте, представляющем собой IL-15.

Длительно действующий агонист IL-15-R может быть получен, как описано в примере 1. Например, длительно действующий агонист IL-15-R, как правило, может быть получен путем реагирования интерлейкина-15, например очищенного IL-15, такого как рекомбинантный IL-15, с реагентом, представляющим собой активированный PEG, таким как активированный сложный эфир, метокси-PEG-сукцинимидилбутианоат, mPEG-SBA. Другие подходящие активированные реагенты PEG включают метокси-PEG-сукцинимидилпропионат, метокси-PEG-сукцинимидилпептаноат и метокси-PEG-сукцинимидилгексаноат. Хотя используют, как правило, сукцинимидильную активирующую группу, любая подхо-

дующая группа активного сложного эфира или активирующая группа может быть использована, где такая реагирующая группа подходит для образования желаемой стабильной амидной связи. Как правило, интерлейкин-15 растворяют в подходящем буфере, таком как например, забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). Реагент PEG может быть добавлен в эквимольном отношении к IL-15 (относительно молярного количества интерлейкина-15), как правило, в растворе в подходящем буфере или в молярном избытке (исходя из молярного количества IL-15), то есть до приблизительно 15-кратного молярного избытка, например, в 2-кратном молярном избытке, или 5-кратном молярном избытке, или 7-кратном молярном избытке, или десятикратном молярном избытке, или даже 12-кратном молярном избытке, или больше. В некоторых вариантах осуществления реагент PEG добавляют в приблизительно 5-10-кратном молярном избытке. Реагент PEG может быть добавлен в твердой форме или в виде раствора в подходящем растворителе, например в водном растворе кислоты, таком как разбавленная хлористоводородная кислота.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления способа интерлейкин-15 изначально присутствует в растворе, т.е. до смешивания с реагентом, представляющим собой метокси-PEG-сукцинимидилалканат, в концентрации от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/мл. Дополнительные иллюстративные диапазоны концентраций включают, например, приблизительно 0,5-5 мг/мл, приблизительно 0,5-4 мг/мл, приблизительно 0,5-3 мг/мл, приблизительно 0,5-2 мг/мл, приблизительно 0,5-1,5 мг/мл, приблизительно 0,5-1 мг/мл, приблизительно 1-10 мг/мл, приблизительно 1-5 мг/мл, приблизительно 1-4 мг/мл, приблизительно 1-3 мг/мл, приблизительно 1-2 мг/мл, приблизительно 1-1,5 мг/мл, приблизительно 1,5-10 мг/мл, 1,5-5 мг/мл, приблизительно 1,5-4 мг/мл, приблизительно 1,5-3 мг/мл, приблизительно 1,5-2 мг/мл, приблизительно 2-10 мг/мл, приблизительно 2-5 мг/мл, приблизительно 2-4 мг/мл, приблизительно 2-3 мг/мл, приблизительно 3-10 мг/мл, приблизительно 3-5 мг/мл, приблизительно 3-4 мг/мл, приблизительно 4-10 мг/мл, приблизительно 4-5 мг/мл или приблизительно 5-10 мг/мл интерлейкина-15 в растворе. В некоторых конкретных, но не ограничивающих вариантах осуществления концентрация интерлейкина-15 в растворе составляет приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 или 10 мг/мл.

Следует отметить, что любой подходящий буфер может быть использован или добавлен в реакционную смесь. Некоторые типичные буферы включают натрий-фосфатный (NaPi), натрий-ацетатный (NaAc), боратный, бисиновый, цитратный и Bis-TRIS буферы.

В некоторых вариантах осуществления pH раствора IL-15 доводят до приблизительно pH 8 перед добавлением реагента PEG.

После добавления реагента PEG реакционная смесь затем может быть при необходимости доведена до подходящего pH, например, от приблизительно 7,0 до 8,5 или до приблизительно 8,0. В некоторых вариантах осуществления реакционную смесь доводят до pH приблизительно 7,0-8,0 или до приблизительно 7,4-8,5. В некоторых конкретных вариантах осуществления реакционную смесь доводят до pH приблизительно 8,0. Следует отметить, что доведение pH можно осуществлять как до, так и после добавления реагента PEG по мере необходимости для достижения желаемого pH.

Интерлейкин-15, подобно многим белкам, подвергается деамидированию, особенно при более высоких pH, тогда как более низкие уровни pH могут приводить к ряду возможных недостатков, таких как, например, более низкая степень конъюгации по эpsilon (ϵ) аминам и/или увеличенные и/или нежелательные позиционные изоформы, а также агрегация белков. Деамидирование вводит в белок отрицательный заряд, что может привести к изменениям активности, структуры, функции, стабильности белка и/или может изменить восприимчивость белка к разложению. Таким образом, одна из задач, решаемая данными агонистами и связанными с ними способами, состояла в том, чтобы обеспечить длительно действующий агонист рецептора интерлейкина-15, который поддерживает достаточную степень активности (т.е. является терапевтически применимым), одновременно сохраняя сбалансированность в отношении по меньшей мере (i) желаемой степени конъюгации, (ii) низких количеств деамидирования фрагмента, представляющего собой интерлейкин-15, как до, так и после конъюгации с рассматриваемыми реагентами PEG (что может, например, приводить к снижению активности интерлейкина-15), и (iii) агрегации белков (например, до и после конъюгации), среди прочего.

Исходя из конкурирующих и противоречивых проблем, связанных с параметрами реакции для получения длительно действующего агониста рецептора интерлейкина-15, описанного в данном документе, заявители обнаружили, что путем доведения pH раствора интерлейкина-15 (до или после реакции с реагентом PEG) и/или реакционной смеси IL-15 с реагентом PEG можно достичь оптимального (более низких уровней) деамидирования, при способствовании по-прежнему конъюгации фрагментов PEG с фрагментом, представляющим собой интерлейкин-15, (например, по ϵ -аминам, а также N-концу) с обеспечением длительно действующего агониста IL-15-R, описанного в данном документе. Без углубления в теорию, на основании серии реакций, в которых варьировали многочисленные параметры реакции, представляется, что диапазон pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,5, или от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,2, или от приблизительно 7,8 до приблизительно 8,2, или при приблизительно 8,0 является эффективным для обеспечения более низких уровней деамидирования в продукте при одновре-

менном способствовании конъюгации фрагментов PEG с образованием продукта, описанного в данном документе, который также сохраняет желательный терапевтический профиль.

Например, способы, описанные в данном документе, эффективны для получения пегелированного интерлейкина-15, который деамидирован менее чем на приблизительно 35%, или в некоторых вариантах осуществления деамидирован менее чем на приблизительно 30%, или деамидирован менее чем на приблизительно 25%, или деамидирован менее чем на приблизительно 20%. В некоторых вариантах осуществления уровень деамидирования продукта находится в диапазоне от приблизительно 20 до 35%, или находится в диапазоне от приблизительно 20 до 25%, или находится в диапазоне от приблизительно 25 до 35%, или находится в диапазоне от приблизительно 25 до 30%. В качестве альтернативы в некоторых вариантах осуществления предусматривается пегелированный интерлейкин-15, характеризующийся меньшими степенями деамидирования, чем указанные выше. Как показано в эксперименте 2 примера 1, доведение рН до значений в диапазоне от приблизительно 7,0 до 8,5 приводило к уровню деамидирования 21,29% (композиция 1) или 33,26% (композиция 2).

Реагенты, как правило, смешивают в течение приблизительно 5-10 ч включительно. В некоторых вариантах осуществления реагенты смешивают в течение приблизительно 2-5 ч включительно. В некоторых вариантах осуществления реагенты смешивают в течение приблизительно 2 ч включительно. В некоторых типичных вариантах осуществления реагенты смешивают в течение от приблизительно 30 мин до приблизительно 3,0 ч, или от приблизительно 30 мин до 2,5 ч, или от приблизительно 30 мин до 2 ч, или от приблизительно 30 мин до 1,5 ч, или от приблизительно 45 мин до приблизительно 3,0 ч, или от приблизительно 45 мин до приблизительно 2,5 ч, или от приблизительно 45 мин до приблизительно 2,0 ч, или от приблизительно 45 мин до приблизительно 1,5 ч, или от приблизительно 45 мин до приблизительно 1,0 ч. Смешивание, как правило, осуществляют при умеренных условиях, например, от приблизительно 20 до приблизительно 65°C, или от приблизительно 20 до приблизительно 40°C, или при окружающей или комнатной температуре (например, приблизительно 22°C). Можно использовать более низкие температуры для способствования более низкой степени пегелирования. Реакционную смесь можно гасить, например, путем добавления аминокислоты, такой как глицин.

В вариантах осуществления рН композиции можно дополнительно регулировать для уменьшения деамидирования. В некоторых вариантах осуществления композицию доводят до рН приблизительно 6,5-7,5 или 6,5-7,0. В некоторых вариантах осуществления композицию доводят до рН приблизительно 6,5, 6,8, 7,0 или 7,5.

Продукт реакции, представляющий собой пегелированный IL-15 , как правило, может затем быть очищен любым подходящим способом, таким как, например, ионообменная хроматография, для получения желаемого продукта. Например, может быть использована анионообменная хроматография. Затем пул продуктов хроматографии может быть концентрирован и подвергнут диафильтрации в подходящем буфере для состава (например, натрий-ацетатном буфере с сахарозой) с использованием, например, тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Анализ может проводиться любым подходящим способом, таким как, например, SDS-PAGE, обращенно-фазовая HPLC или любым другим подходящим аналитическим способом.

Как описано ранее, аминокислоты в фрагменте, представляющем собой IL-15 , обеспечивают участок связывания между фрагментом, представляющим собой IL-15 , и фрагментом полиэтиленгликоля с обеспечением длительно действующих агонистов IL-15-R , таких как охватываемые формулой (I). Например, при рассмотрении иллюстративных аминокислотных последовательностей IL-15 , представленных в данном документе, очевидно, что имеется семь остатков лизина, каждый из которых характеризуется наличием ϵ -аминокислоты, которая может быть доступна для конъюгации. Кроме того, N-концевой амин метионина также может служить в качестве точки присоединения к фрагменту PEG. Следует отметить, что полиэтиленгликолевый фрагмент может быть присоединен в любых одном или нескольких положениях лизина или N-концевого амина. В некоторых вариантах осуществления участок присоединения полиэтиленгликолевого фрагмента находится на одном или нескольких из Lys^{10} и Lys^{11} (с использованием нумерации, показанной в SEQ ID NO: 2, в качестве примера или Lys^{11} и Lys^{12} с использованием SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликолевый фрагмент присоединяется по N-концевому амину. Следует отметить, что любое из положений лизина может быть подходящим в качестве участка присоединения (например Lys^{37} или Lys^{42} из SEQ ID NO: 1) для фрагмента PEG. В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора интерлейкина-15 предусматривает смесь позиционных изомеров, при этом ковалентное присоединение полиэтиленгликолевого фрагмента преимущественно происходит на N-конце (то есть из всей совокупности позиционных изомеров изомер с фрагментом PEG, присоединенным на N-конце, присутствует в наибольшем количестве по сравнению с другими позиционными изомерами).

При необходимости пул продуктов может быть далее разделен на позиционные изомеры посредством обращенно-фазовой хроматографии с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) при использовании 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, ионообмен-

ной колонки Sepharose™, доступной от Amersham Biosciences. Любой из этих подходов можно применять для разделения позиционных изомеров PEG-интерлейкин-15 с одинаковой молекулярной массой (т.е. позиционных изоформ).

Гельфилтрационные колонки, подходящие для проведения разделения этого типа, включают колонки Superdex™ и Sephadex™, доступные от GE Healthcare (Бакингемшир, Великобритания). 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 для определения содержания белка, (ii) анализа белка, основанный на использовании красителя, с применением бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта, (iii) тестирования с использованием йода в отношении содержания PEG (Sims et al. (1980) Anal. Biochem, 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).

Было обнаружено, что данные длительно действующие агонисты IL-15-R обладают определенными заметными и полезными свойствами. Хотя признаки, описанные ниже, как полагают, применимы в целом к соединениям, представленным в данном документе и охватываемым формулой (I), следующие один или несколько признаков могут демонстрировать, в частности, соединения согласно формуле (Ib) и, соответственно, формуле (IIb). Длительно действующий агонист IL-15-R может обладать одним или несколькими из следующих признаков. Например, в некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 демонстрирует не более чем приблизительно 7-кратное снижение значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с немодифицированным IL-15. Например, в одном или нескольких родственных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется не более приблизительно 6,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 6-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 5,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 4,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 4-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или не более приблизительно 3,5-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), или даже не более приблизительно 3-кратным снижением значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с IL-15. Иллюстративные длительно действующие агонисты IL-15-R в соответствии с вышеуказанными признаками описаны в данном документе и в прилагаемых примерах.

Как описано в примере 10, *in vitro* активность иллюстративных конъюгатов (1, 3 и 5) индуцирует передачу сигнала с участием IL-15 в huPBMC, при этом конъюгат 1 эффективно индуцирует такую передачу сигнала. Дополнительные эксперименты проводили для исследования *in vitro* активности конъюгата 1 в отношении человеческих CD8 Т-клеток, NK-клеток и CD4 Т-клеток (примеры 16, 22 и 26-27). Как показано на фиг. 10А-10В, по меньшей мере конъюгат 1 индуцировал схожую или усиленную передачу сигнала по сравнению с IL-15 в клетках CD56bright и CD56low. Хотя конъюгат 1 был менее эффективным, чем IL-15 в отношении рекрутинга CD8 и CD56bright NK-клеток (пример 22), важно отметить, что конъюгат 1 достигал того же максимального ответа, что и традиционный IL-15 (см. фиг. 38А-38В). Как описано для мышинной модели в примере 16, однократная инъекция конъюгата 1 в двух разных дозах индуцировала устойчивую передачу сигнала pSTAT в CD8 и NK-клетках. Как описано для мышинной модели в примере 26, однократная инъекция конъюгата 1 приводила к повышению % pSTAT5 по сравнению с IL-15. В мышинных моделях NK-клетки были наиболее чувствительными к однократной дозе конъюгата, за которыми следовали CD8 Т-клетки, а CD4 Т-клетки были наименее чувствительными из тестируемых клеток.

Конъюгат 1 также индуцировал передачу сигнала в NK-клетках, CD8 Т-клетках и CD4 Т-клетках в модели на основе отличных от человека приматов (модели на основе яванского макака в примере 27). Как и в мышинной модели, NK-клетки были наиболее чувствительными к индуцированию конъюгатом 1.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 демонстрирует не более чем приблизительно 50% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с IL-15. То есть в некоторых связанных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 демонстрирует не более чем приблизительно 45% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или демонстрирует не более чем приблизительно 40% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или демонстрирует не более чем приблизительно 35% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), или даже демонстрирует не более чем приблизительно 30% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с IL-15.

Предпочтительно длительно действующий агонист рецептора IL-15 демонстрирует не более чем приблизительно 7-кратное снижение значения EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) по сравнению с немодифицированным IL-15 и не более чем приблизительно 50% снижение связывания альфа-рецептора (K_D ,

пМ) по сравнению с PL-15, включая любую одну или несколько конкретных комбинаций снижения значений EC50 или значений K_D , описанных выше.

Необязательно, длительно действующий агонист рецептора PL-15 содержится в композиции, которая содержит одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Иллюстративные вспомогательные вещества включают без ограничения таковые, выбранные из группы, состоящей из углеводов, неорганических солей, противомикробных средств, антиоксидантов, поверхностно-активных веществ, буферов, кислот, оснований, аминокислот и их комбинаций.

В качестве вспомогательного вещества может присутствовать углевод, такой как сахар, дериватизированный сахар, такой как альдит, альдоновая кислота, эстерифицированный сахар и/или полимер на основе сахара. Конкретные углеводные вспомогательные вещества 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.

Вспомогательное вещество также может включать неорганическую соль или буфер, как например 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, тем самым 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, формальдегидсульфоксидат натрия, метабисульфит натрия и их комбинации.

В качестве вспомогательного вещества может присутствовать поверхностно-активное вещество. Типичные 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 (однако предпочтительно не находящиеся в липосомальной форме), жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот; стероиды, такие как холестерин; и хелатирующие PL-15 средства, такие как EDTA, цинк и другие такие подходящие катионы.

В качестве вспомогательного вещества в композиции могут присутствовать кислоты или основания. Неограничивающие примеры кислот, которые можно применять, включают кислоты, выбранные из группы, состоящей из хлористоводородной кислоты, уксусной кислоты, фосфорной кислоты, лимонной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты, муравьиной кислоты, трихлоруксусной кислоты, азотной кислоты, перхлорной 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 вспомогательного вещества в композициях, описанных в данном документе, может присутствовать одна или несколько аминокислот. Иллюстративные аминокислоты при этом включают аргинин, лизин и глицин. Дополнительные подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают описанные, например, в Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012.

Количество длительно действующего агониста PL-15-R, содержащегося в композиции, будет варьировать в зависимости от ряда факторов, но оптимально будет представлять собой терапевтически эффективную дозу, если композиция хранится 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 повторного введения повышающихся количеств длительно действующего агониста PL-15-R для определения количества, которое дает клинически требуемый ожидаемый результат, описанный в данном документе. Количество любого отдельного вспомогательного вещества в композиции будет варьировать в зависимости от активности вспомогательного вещества и определенных требований в отношении композиции. Как правило, оптимальное количество любого отдельного вспомогательного вещества определяют посредством обычного экспериментирования, т.е. с помощью получения композиций, содержащих варьирующие количества вспомогательного вещества (в диапазоне от низких до высоких), проверки устойчивости и других параметров и затем определения диапазона, при котором достигается оптимальная эффективность при отсутствии существенных неблаго-

приятных эффектов.

Длительно действующий агонист IL-15-R является подходящим для введения пациенту, страдающему состоянием, которое отвечает на лечение интерлейкином-15. Способ предусматривает введение пациенту, как правило парентерально, терапевтически эффективного количества длительно действующего агониста IL-15-R (предпочтительно предоставляемого в качестве части фармацевтической композиции). Как описано ранее, длительно действующий агонист IL-15-R можно вводить парентерально (например, внутримышечно, подкожно, внутривенно или внутривентриально). Подходящие типы составов для парентерального введения, среди прочего, включают растворы, готовые для инъекции, сухие порошки для объединения 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. В некоторых конкретных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 предоставляется в составе, подходящем для внутривенного введения, и вводится внутривенно. В некоторых других вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 предоставляется в составе, подходящем для подкожного введения, и вводится подкожно.

Способ введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, предоставляемого в качестве части фармацевтической композиции) необязательно может проводиться так, чтобы ограничить локализацию агониста конкретной областью. Например, жидкие, гелевые и твердые составы, содержащие агонист, также 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 длительно действующего агониста IL-15-R, такого как, например, рак. Например, длительно действующий агонист может быть использован либо отдельно, либо в комбинации с другим фармакотерапевтическим средством для лечения пациентов, страдающих состоянием, которое может отвечать на терапию IL-15, таким как, например, рак.

Как используется в данном документе в отношении лечения субъекта, имеющего рак, термины "лечение", "лечить" и "лечащий" включают полный спектр воздействий, производимых в отношении рака, которым страдает субъект, как например введение комбинации для облегчения, замедления, прекращения или купирования одного или нескольких симптомов рака или для задержки прогрессирования рака, даже если рак фактически не устранен. Лечение может включать, например, уменьшение тяжести симптома, количества симптомов или частоты рецидивов, например, ингибирование роста опухоли, остановку роста опухоли или регрессию уже существующих опухолей.

Например, улучшение при раке или заболевании, связанном с раком, можно охарактеризовать как полный или частичный ответ. "Полный ответ" относится к отсутствию клинически выявляемого заболевания с нормализацией любых ранее аномальных рентгенологических исследований, измерений в отношении костного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) или аномальных моноклональных белков. "Частичный ответ" относится к снижению по на меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всей измеряемой опухолевой нагрузки (т.е. количества злокачественных клеток, присутствующих у субъекта, или измеренного объема опухолевых масс, или количества аномального моноклонального белка) в отсутствие новых поражений. Термин "лечение" подразумевает как полный, так и частичный ответ.

Термины "рак" и "раковый" относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток.

"Опухоль" и "солидная опухоль", как используется в данном документе, относятся к ко всем поражениям, а также к росту и пролиферации неопластических клеток, являющихся как злокачественными, так и доброкачественными, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

Типичными состояниями являются виды рака, такие как, например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, рак базальных клеток, рак головы и шеи, аденокарцинома, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечноклеточный рак, гепатома, рак желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональный рак, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома (в том числе, например, увеальная меланома, меланома слизистой оболочки и лептотемингеальная меланома), нейробластома, регинобластома и лейкозы.

Согласно одному конкретному способу длительно действующий агонист IL-15-R используется для лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как лейкозы или лимфома. Со-

гласно еще одному способу длительно действующий агонист IL-15-R используется для лечения солидного рака.

В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15-R или композиция эффективны при введении в терапевтически эффективной дозе субъекту для стимуляции активации и/или пролиферации НК.

В иллюстративной мышинной модели, как описано в примере 11, конъюгат 1 был эффективен в отношении индуцирования пролиферации и устойчивого повышения количества НК-клеток, о чем свидетельствовало повышенное количество клеток (клеток/мкл, как показано на фиг. 12B-12C), а также повышение % Ki67 (например фиг. 11A). % Ki67 используют в качестве маркера для пролиферирующих клеток. Как видно на фиг. 12A-12D, повышение количества клеток наблюдали у НК-клеток всех уровней зрелости (концевых эффекторных клеток, НК-клеток-предшественников, высокоэффекторных клеток и ранних НК-клеток). Как показано в примере 17, повышение количества НК-клеток было устойчивым при всех уровнях доз в течение по меньшей мере 96 ч, при этом средние и высокие уровни дозы поддерживались в течение по меньшей мере 144 ч. Введение конъюгата 1 в мышинной модели индуцировало повышение % Ki67 при всех уровнях доз по сравнению со средой-носителем, которое поддерживалось в течение по меньшей мере 120 ч. Что касается % Ki67, то по меньшей мере диапазоны средних доз (например 0,1 и 0,3 мг/кг) индуцировали повышение % Ki67, которое поддерживалось в течение по меньшей мере 144 ч.

Эффекты конъюгата 1 могут быть индуцированы и могут поддерживаться при однократной дозе. В иллюстративной мышинной модели, как описано в примере 11, при введении однократной дозы конъюгата 1 было индуцировано и поддерживалось повышение количества клеток. При однократной дозе уровни % Ki67 индуцировались и были устойчивыми в мышинных CD49b клетках по сравнению с повторным (например, Q7dx3) введением дозы того же уровня (см. фиг. 28A).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15-R или композиция при введении в терапевтически эффективной дозе являются эффективными в отношении повышения активации НК-клеток, о чем свидетельствует усиление экспрессии цитотоксической протеазы НК-клетками. В иллюстративной модели на основе отличных от человека приматов, как описано в примере 28, экспрессия НК-клетками цитолитических ферментов гранзима В и перфорина индуцировалась и усиливалась однократной дозой конъюгата 1. Как видно на фиг. 48A-48C, все уровни дозы усиливали экспрессию гранзима В, а средние/более высокие дозы, по меньшей мере, утраивали экспрессию (MFI) по сравнению с уровнями до введения дозы. Как видно на фиг. 49A-49C, все уровни дозы усиливали экспрессию перфорина, а средние/более высокие дозы удваивали экспрессию (MFI) по сравнению с уровнями до введения дозы. Таким образом, конъюгат 1 является эффективным в отношении усиления цитотоксичности НК-клеток.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15-R или композиция эффективны при введении в терапевтически эффективной дозе субъекту в отношении поддержания выживания CD8 T-клеток и формирования ими памяти.

В иллюстративной мышинной модели однократная доза при всех уровнях доз конъюгата 1 усиливает клеточную пролиферацию, о чем свидетельствует повышение % положительности в отношении Ki-67 в CD8 клетках (фиг. 30D), а также в субпопуляциях центральных клеток памяти и эффекторных CD8 клеток памяти (фиг. 30E-30F). Как показано в примере 17, введение конъюгата 1 в мышинной модели индуцировало значительное повышение общего количества CD8 T-клеток в крови (см. фиг. 30A). Самая низкая доза повышала CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} (см. фиг. 30B-30C). В иллюстративной мышинной модели однократная iv инъекция конъюгата 1 поддерживала повышенные количества клеток по сравнению с введением среды-носителя в течение по меньшей мере 240 ч (см. фиг. 30A, например). Следует отметить, что количества CD8 T-клеток и CD8 T-клеток памяти не возвращаются к исходному уровню через 240 ч после инъекции при введении конъюгата 1 при некоторых уровнях доз. Таким образом, конъюгат 1 поддерживает популяции CD8+ T-клеток памяти в течение продолжительного периода. Однократная доза конъюгата 1 при всех уровнях доз также усиливала положительность в отношении Ki-67 во всех CD8 T-клетках и субпопуляциях CD8 T-клеток, указывая на усиленную пролиферацию этих клеток. Повторное введение дозы конъюгата 1 приводило к дальнейшему увеличению популяций CD8, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} (см. фиг. 31A-31C). Повторное введение дозы также приводило к долгосрочным усилениям клеточной пролиферации в течение по меньшей мере 240 ч для каждой из популяций CD8-клеток, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} у мышей.

Конъюгат 1 также индуцировал пролиферацию и устойчивое повышение количества НК-клеток и CD8 T-клеток в модели на основе отличных от человека приматов (модели на основе яванского макака в примере 27) по сравнению с введением среды-носителя. Каждый уровень дозы конъюгата 1 индуцировал и поддерживал повышение количества НК-клеток в течение по меньшей мере 14 дней (см. фиг. 44A). Конъюгат 1 индуцировал и поддерживал повышение количества CD8 T-клеток в течение по меньшей мере 10 дней при каждом уровне доз.

В еще одном или нескольких дополнительных вариантах осуществления агонист IL-15-R вводят внутривенно. В еще дополнительных вариантах осуществления агонист IL-15-R вводят подкожно.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления при введении агонист IL-15-R является эффективным в отношении индуцирования устойчивой передачи сигнала в лимфоцитах, что приводит к пролиферации CD8 Т-клеток и/или преимущественному увеличению популяции центральных CD8-клеток памяти.

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. Данную дозу можно периодически вводить до тех пор, пока, например, врач не определит достижение подходящего ожидаемого результата (например, излечения, регрессии, частичной регрессии и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза варьирует от приблизительно 0,25 до 25 мкг/кг. В других вариантах осуществления терапевтически эффективная доза варьирует от приблизительно 0,25 мкг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг/кг в день или от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг в день. В других вариантах осуществления терапевтически эффективная доза варьирует от приблизительно 1 до 10 мкг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых конкретных, но не ограничивающих вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет приблизительно 0,25 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 10 мкг/кг, 15 мкг/кг, 20 мкг/кг, 25 мкг/кг, 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг. Со ссылкой на дозы, указанные в приведенных в данном документе примерах, специалист в данной области может преобразовать дозы для животных (например, мыши) в соответствующую дозу для людей с использованием преобразований, известных в уровне техники (например, Nair et al., *J. Basic and Clin. Pharmacy* (2016) 7:27-31).

Единицу дозирования любого указанного конъюгата (в данном 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. Конкретная схема дозирования будет известна специалисту в данной области или ее можно определить экспериментально с применением обычных способов. Иллюстративные режимы введения дозы включают без ограничения введение один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, два раза в месяц (например, каждые 14 дней), один раз в месяц (например каждые 30 или 31 день или каждый 21 день) и любую их комбинацию. Как только желаемый клинический результат достигнут, введение доз композиции прекращают или снижают. В некоторых вариантах осуществления стандартная доза любого данного конъюгата может быть введена один раз с обеспечением устойчивого эффекта.

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано вместе с его предпочтительными конкретными вариантами осуществления, вышеизложенное описание, а также примеры, которые следуют далее, 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, тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае несоответствия между идеями настоящего описания и уровнем техники, включенным в качестве ссылки, значение идей и определений в настоящем описании должно иметь преимущественную силу (особенно в отношении терминов, используемых в формуле изобретения, прилагаемой в данном документе). Например, если настоящая заявка и публикация, включенная в качестве ссылки, по-разному определяют один и тот же термин, то определение этого термина должно быть сохранено в пределах идей документа, в котором определение находится.

Примеры

Следует понимать, что вышеприведенное описание, а также приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, представленного в данном документе. Другие аспекты, преимущества и модификации будут очевидны для специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

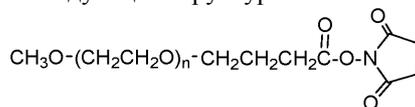
В следующих примерах были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температур и т.д.), но следует принимать во внимание некоторую экспериментальную ошибку и отклонение. Если не указано иначе, температура выражается в градусах С, и давление представляет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

Материалы и способы

Рекомбинантный IL-15 ("rIL-15") под SEQ ID NO: 1 (как представлено на фиг. 1), полученный с использованием традиционных методик, использовали в следующих примерах, хотя любой подходящий

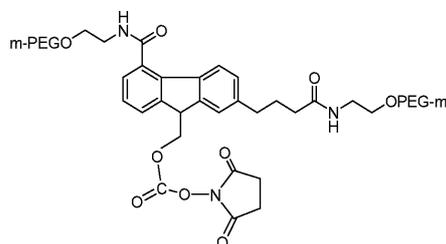
фрагмент, представляющий собой IL-15, может быть использован подобным образом. SEQ ID NO: 1, представляющая собой рекомбинантный человеческий IL-15, полученный из E.coli, представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 115 аминокислот, с молекулярной массой 12,9 кДа.

Реакционноспособный полимерный реагент линейный mPEG-сукцинимидилбутаноат массой 40 кДа ("mPEG-SBA") характеризуется следующей структурой:



где n соответствует числу мономерных субъединиц, обеспечивающих полимер со средневесовой молекулярной массой приблизительно 40 килодальтон, т.е. где n равняется ~909. Дополнительные mPEG-сукцинимидилбутаноатные реагенты, подходящие для применения, включают имеющие средневесовые молекулярные массы, например, приблизительно 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 40 кДа, 50 кДа или 60 кДа. Такой активированный полимерный реагент при реагировании с аминогруппами IL-15 (например, лизинами или N-концом) эффективно образует стабильную амидную связь между фрагментом, представляющим собой IL-15, и полиэтиленгликолевый фрагментом.

Реакционноспособный реагент флуоренил-PEG, PEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS, характеризуется следующей структурой:



где mPEG представляет собой метокси(полиэтиленгликоль), и средневесовая молекулярная масса полимерного реагента составляет приблизительно 20 кДа (т.е. с каждым фрагментом mPEG со средневесовой молекулярной массой приблизительно 10 кДа). Дополнительные реагенты PEG2-CAC-FMOC, имеющие различные молекулярные массы, названы соответственно, например, PEG2-CAC-FMOC-10kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-15kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-30kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-40kD-NHS, при этом такие реагенты имеют структуру, показанную выше, и отличаются только молекулярной массой фрагментов "mPEG", присоединенных к ядру FMOC.

Анализ SDS-PAGE

Образцы анализировали в помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с использованием системы электрофореза в геле Invitrogen (XCell SureLock Mini-Cell). Образцы смешивали с буфером для образцов. Затем полученные образцы загружали в предварительно изготовленный гель NuPAGE Novex и прогоняли в течение примерно 30 мин.

Анализ RP-HPLC

Анализ обращенно-фазовой хроматографии (RP-HPLC) проводили на системе HPLC Agilent 1200 (Agilent). Образцы анализировали с использованием колонки Poroshell 300SB-C3 (2,1×75 мм, Agilent) при 60°C. Используемыми подвижными фазами были 0,1% TFA/H₂O (A) и 0,1% TFA/CH₃CN (B). Скорость потока колонки составляла 0,5 мл/мин. Элюированный белок и конъюгаты PEG-белок выявляли с использованием УФ при 280 нм.

Биоанализы

Анализ эффективности (мышинная Т-клетка) на основе фосфорилирования STAT5 в клетках CTLL-2

В анализе фосфо-STAT5 после связывания рецептора передача сигнала в клетке в далее по сигнальному пути затем может активировать переносчик сигнала и активатор транскрипции 5 (STAT5) посредством фосфорилирования для способствования генной экспрессии с индуцированием пролиферации клеток. Активацию фосфо-STAT5 измеряют в клетках CTLL-2, представляющих собой линию мышинных Т-лимфоцитов, с использованием мультиплексного анализа фосфо-STAT5/суммарный STAT5 (Meso Scale Discovery, Мэриленд) в ответ на обработку образца и эталона в течение ~10 мин.

За один день до анализа отбирали клетки CTLL-2 с помещением в свежую ростовую среду [RPMI 1640, дополненную 10% FBS, 10% добавкой для Т-клеточной культуры (№ по каталогу 354115, Corning, Inc., Тьюксберри, Массачусетс), 2 мМ L-глутаматом и 1 мМ пируватом натрия]. В день анализа клетки предварительно инкубировали в среде для анализа (RPMI 1640 с добавлением 1% FBS, 2 мМ L-глутамата и 1 мМ пирувата натрия) в течение по меньшей мере 4 ч и затем высевали в среду для анализа в 96-луночном планшете при 50000 клеток/луночка. Разведения тестируемого изделия готовили в соответствующем буфере непосредственно перед анализом. Стимуляцию клеток CTLL-2 инициировали переносом 25X растворов тестируемого изделия в лунки, содержащие клетки CTLL-2, в трех повторностях. План-

шеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 10 мин, и реакцию останавливали путем лизиса клеток. Выявление уровней фосфо-STAT5 и общего белка STAT5 в клеточных лизатах выполняли с использованием набора MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa, b Whole Cell Lysate Kit (Meso Scale Discovery, Мэриленд). После 10-минутной обработки рекомбинантный человеческий IL-15, полученный от ProgenTech, демонстрировал активность IL-15, индуцируя фосфорилирование STAT5 в клетках CTLL-2 со средним значением EC50 0,27 нг/мл, которое служило в качестве контроля.

Анализ HuPBMC-pStat5

Эффективность IL-15 или длительно действующих агонистов IL-15-R в отношении различных субпопуляций лимфоцитов человека определяли с помощью анализа ответа от дозы с применением фосфо-STAT5(Y694). Замороженные PBMC человека от нескольких доноров были получены от AllCells. 1×10⁶ клеток/100 мкл культивировали в полной среде RPMI в течение 2 ч, а затем инкубировали с указанными концентрациями (серийные разведения от 10000 нг/мл до 0,001 нг/мл) IL-15 или конъюгатов в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки фиксировали (используя BD Cytofix), пермеабилizировали (используя 100% предварительно охлажденный метанол) и окрашивали с использованием антител к CD3, CD4, CD8, CD4-регуляторных T-клеток (CD4+ CD25+ Foxp3+), CD56 и фосфорилированному STAT5 (Y694) перед анализом методом проточной цитометрии. Соотношения концентрация-ответ использовали для вычисления значений EC50.

Аффинности в отношении рецепторов длительно действующих агонистов рецептора rIL-15 для IL-15Rα

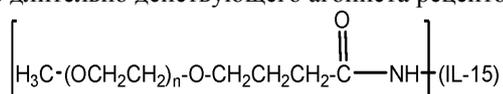
Аффинности IL-15 и иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора rIL-15 измеряли с использованием поверхностного плазмонного резонанса ("SPR") с использованием системы SPR VIAcore™. Вкратце, поверхность сенсорного чипа

Viacore CM5 активировали с использованием смеси 1:1 NHS:EDC с образованием активных сложных эфиров NHS. Антитело козы к Fc иммуноглобулина человека ковалентно присоединяли к поверхности путем его инъектирования в течение пяти минут в 10 мМ ацетате натрия (pH 4). Примерно 8000 ЕО антител связывалось с поверхностью. Любое количество оставшегося сложного эфира NHS затем гасили этаноламином.

При инициации каждого цикла инъектирования IL-15-Rα-Fc захватывался в канале сенсорного чипа посредством стадии пятиминутного инъектирования в PBSP. Как правило, 150-200 ЕО рецепторов связывалось на поверхности.

Тестируемые изделия длительно действующего агониста рецептора rIL-15 разбавляли до 10 мкМ в PBS (содержащем 0,05% Tween 20 и 0,1 мг/мл BSA). Получали серии 3-кратных разбавлений и инъектировали в сенсорный чип, который был покрыт IL-15Rα. Аффинности измеряли путем определения скоростей k_a и k_d отдельно, и отношение k_d к k_a использовали для вычисления значений K_d.

Пример 1. Получение длительно действующего агониста рецептора IL-15



моно(метоксиPEG-N-бутанамид)_{40 кДа}интерлейкин-15.

Эксперимент 1.

2,7 мл раствора IL-15 (1,23 мг/мл в буфере PBS, pH 7,4) переносили в небольшой реакционный флакон. Добавляли 300 мкл 0,6 М боратного буфера при pH 8 для доведения pH до pH 8. mPEG-SBA, 40 кДа, хранящегося при -20°C под азотом, нагревали до окружающей температуры. Десятикратный избыток (относительно молярного количества IL-15) mPEG-SBA-40K растворяли в 2 мМ HCl с образованием 10% раствора реагента PEG. Быстро добавляли 10% раствор реагента PEG в раствор IL-15 и хорошо смешивали. После добавления mPEG-SBA-40K pH реакционной смеси определяли и доводили до pH 8 с использованием традиционных методик. Для обеспечения связывания mPEG-SBA-40K с IL-15 (т.е. посредством образования стабильной амидной связи) реакционный раствор помещали в низкоскоростной лабораторный вращатель на 1,5 ч для способствования конъюгации при комнатной температуре. Реакцию гасили путем добавления раствора глицина.

Фиг. 2 демонстрирует хроматограмму после анализа RP-HPLC конъюгационной реакционной смеси. Соединения, полученные в ходе реакции, составляли 40% моноконъюгата (т.е. имеющего один фрагмент PEG, присоединенный к IL-15), 24% диконъюгата (имеющего два PEG, присоединенных к IL-15) и 6% триконъюгата (имеющего три PEG, присоединенных к IL-15). Примерно 30% непрореагировавшего IL-15 оставалось в реакционной смеси, хотя условия реакции не были оптимизированы.

Требуемый моноконъюгат отделяли/выделяли путем анионообменной хроматографии с использованием колонки Q Sepharose High Performance и натрий-фосфатных буферов в качестве элюентной фазы. Очищенный конъюгат моно-mPEG-SBA40K-IL-15 (также называемый в данном документе моно-mPEG-бутанамид-40K-IL-15, или моно(метокси-PEG-N-бутанамид)_{40 кДа}интерлейкин-15, или моно-mPEG_{40K}-C4-амид-IL-15) охарактеризовывали путем HPLC и SDS-PAGE. В остальных примерах очищенный моно-

mPEG-SBA40K-IL-15 называют конъюгатом 1.

Фиг. 3 представляет собой профиль очистки FPLC из анион-обменной хроматографической колонки. Фиг. 4 демонстрирует SDS-гель для очищенного конъюгата моно-mPEG-SBA-40K-IL-15. Как показано с помощью геля, очищенный конъюгат обладает высоким уровнем чистоты и не содержит непрореагировавшего IL-15. Фиг. 5 демонстрирует анализ RP-HPLC очищенного моно-mPEG-SBA-40K-IL-15. Как можно видеть из результата HPLC, в составе очищенного моно-mPEG-SBA-40K-IL-15 содержится менее приблизительно 10% (молярного количества) ди-конъюгата или конъюгатов более высокого уровня.

С использованием данного подхода получают конъюгаты, такие как моно-mPEG-SBA-10K-IL-15, моно-mPEG-SBA-15K-IL-15, моно-mPEG-SBA-20K-IL-15, моно-mPEG-SBA-25K-IL-15, моно-mPEG-SBA-30K-IL-15, моно-mPEG-SBA-40K-IL-15, моно-mPEG-SBA-50K-IL-15 и моно-mPEG-SBA-60K-IL-15, с использованием mPEG-SBA, имеющего разные средневесовые молекулярные массы.

Эксперимент 2.

Раствор примерно 2 мг/мл IL-15 в буфере (50 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 10% сахарозы, pH 7,4) перенесли в каждый из двух разных реакционных сосудов (что называют в данном документе композицией 1 и композицией 2). Для доведения pH до 8,0 добавляли боратный буфер (0,4 М или 0,6 М), имеющий pH 8. Добавляли десятикратный избыток (относительно молярного количества IL-15) mPEG-SBA-40K (mPEG-SBA, 40 кДа), разбавленного в 2 мМ HCl, в каждый из растворов IL-15 и хорошо смешивали. После добавления mPEG-SBA-40K pH реакционной смеси определяли как pH 8 или при необходимости доводили путем применения дополнительного количества боратного буфера. Конечную концентрацию IL-15 в реакции приводили к 1 г/л, при необходимости используя дополнительный разбавитель (буфер, содержащий 50 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 10% сахарозы, с pH 7,4 использовали для композиции 1 и воду использовали для композиции 2). Для обеспечения связывания mPEG-SBA-40K с IL-15 (т.е. посредством образования преимущественно стабильных амидных связей) реакционный раствор перемешивали в течение 45 или 60 мин для способствования конъюгации при комнатной температуре для композиции 1 или композиции 2 соответственно. Реакцию гасили путем добавления 71-кратного избытка глицина (относительно молярного количества PEG), первоначально добавленного в реакционную смесь, при pH 8,0 в течение 30 мин. Для композиции 1 pH доводили титрованием до pH 7,0 с использованием 0,2 М фосфорной кислоты.

Полученную композицию характеризовали с помощью обращенно-фазовой HPLC (RP-HPLC), SDS-PAGE и ионообменной HPLC (IEX-HPLC). Результаты анализа RP-HPLC представлены в табл. 1А ниже.

Таблица 1А

	Компонент	Средний % площади
Композиция 1	IL-15	0,57
	Монопегилированный IL-15	82,66
	RRT1=пик T1 (не охарактеризовано)	8,05
	RRT2=пик T2 (не охарактеризовано)	5,17
	RRT3=пик T3 (не охарактеризовано)	3,57
Композиция 2	IL-15	0,36
	Монопегилированный IL-15	92,17
	RRT1=пик T1 (не охарактеризовано)	2,26
	RRT2=пик T2 (не охарактеризовано)	3,28
	RRT3=пик T3 (не охарактеризовано)	1,93

RRT представляет собой относительное время удерживания. Результаты анализа SEC-HPLC представлены в табл. 1В ниже.

Таблица 1В

	Компонент	Средний % площади
Композиция 1	Соединения с HMW	5,56
	Ди-mPEG IL-15 (димер)	15,46
	Моно-mPEG IL-15 (мономер)	78,98
Композиция 2	Соединения mPEG с HMW	5,25
	Ди-mPEG IL-15	6,62
	Моно-mPEG IL-15	88,14

HMW=конъюгаты mPEG-IL-15 с высокой молекулярной массой, содержащие 3 или более PEG, ковалентно присоединенных к интерлейкину-15.

Результаты анализа IEX-HPLC представлены в табл. 1В ниже.

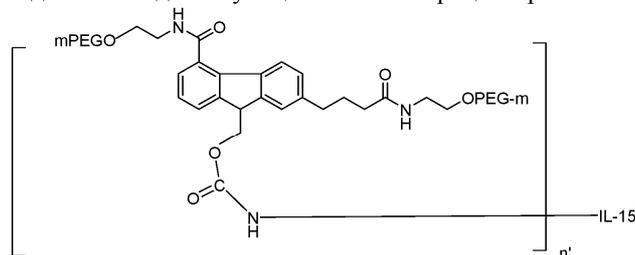
Таблица 1С

		Средний % площади
Композиция 1	Основная область	10,20
	Главный пик	68,53
	Кислотная область	21,29
Композиция 2	Основная область	10,43
	Главный пик	56,32
	Кислотная область	33,26

Полученные композиции преимущественно содержали монопегилированные соединения mPEG-SBA-40K с менее чем 10% димера PEG (т.е. содержащего 2 фрагмента PEG, присоединенных к IL-15) и даже более низкими количествами соединений с более высоким содержанием PEG (т.е. с 3 или более фрагментами PEG, присоединенными к IL-15).

Кроме того, композиции имели относительно низкую степень деамидирования (обозначено как "кислотная область" в табл. 1С). Композиция 1 была деамидирована на 21,29%, а композиция 2 была деамидирована на 33,26%.

Пример 2. Получение длительно действующего агониста рецептора IL-15

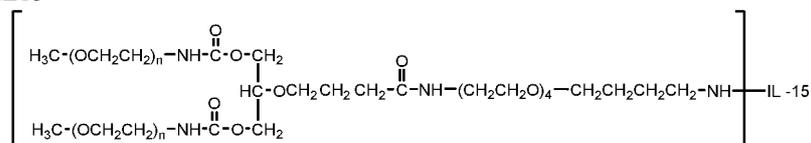


Нагревали mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS, который хранили при -80°C под азотом, до окружающей температуры с продувкой азотом. Исходный раствор (200 мг/мл) mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS получали в 2 мМ HCl и добавляли mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS к rIL-15 при молярных отношениях mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS к rIL-15, находящихся в диапазоне от 5:1 до 100:1. Конечная концентрация rIL-15 в смеси составляла 0,5 мг/мл (0,031 мМ). В смесь добавляли натрий-бикарбонатный буфер (1 М, pH 8,0) до достижения конечной концентрации 100 мМ, и обеспечивали протекание конъюгации в течение 30 мин с получением конъюгата [mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS]-[rIL-15] (при этом неформальное название конъюгата отражает полимерный реагент, используемый для получения конъюгата, с пониманием того, что для полученного продукта(ов) реакционноспособный фрагмент в полимерном реагенте был заменен связью, например, с IL-15). По истечении 30 мин обеспечили гашение реакции посредством добавления к реакционной смеси 1 М глицина (pH 6,0) с достижением конечной концентрации 100 мМ. Затем pH подвергнутой гашению реакционной смеси доводили до 4,0 с использованием ледяной уксусной кислоты перед очисткой посредством колоночной хроматографии и характеристикой.

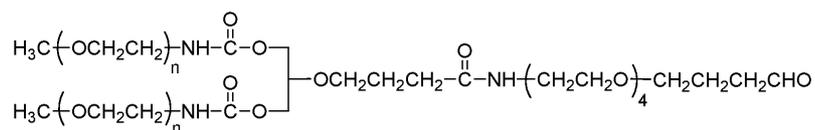
Реакционную смесь анализировали с помощью анализа RP-HPLC. По данным SDS-PAGE реакционная смесь содержала приблизительно 10-20% моноконъюгатов, приблизительно 50-70% диконъюгатов и приблизительно 20-30% триконъюгата, то есть реакционная смесь содержала преимущественно диконъюгированные соединения. Смесь конъюгатов отделяли/выделяли анионообменной хроматографией с использованием колонки Q Sepharose High Performance и натрий-фосфатных буферов в качестве элюентной фазы с получением очищенного [mPEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS]-IL-15 со средней степенью пегилирования, составляющей приблизительно 2 (при этом степень пегилирования варьировала от приблизительно 1,7 до 2,5), вследствие чего величина n' в показанной выше структуре для очищенной композиции составляла приблизительно 2.

В остальных примерах очищенный [mPEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS]-IL-15 будет обозначаться как конъюгат 2.

Пример 3. Получение длительно действующего агониста рецептора IL-15 [моно-PEG2-RU-ButryALD-40K]-IL15



Разветвленный реагент PEG mPEG-бутиральдегид, представляющий собой моно-PEG2-RU-ButryALD-40K



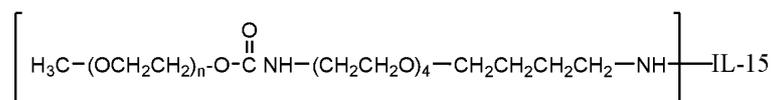
использовали для получения заявляемого длительно действующего агониста IL-15-R, при этом средневесовая молекулярная масса реагента PEG, используемого для получения агониста, составляла приблизительно 40000 Да.

2,7 мл IL-15 (1,23 мг/мл в буфере PBS, pH 7,4) переносили в небольшой реакционный сосуд, добавляли 0,3 мл 1 М натрий-ацетатного буфера (pH 5) для доведения pH до pH 6. mPEG2-ru-ButyrALD, 40 кДа, хранившийся при -20°C под азотом, нагревали до окружающей температуры. Пятнадцатикратный избыток (относительно количества IL-15) mPEG2-ru-ButyrALD растворяли в MilliQ H₂O с получением 10% раствора реагента. 10% раствор реагента быстро добавляли в раствор IL-15, и хорошо смешивали, и помещали в RotoMixer на 15 мин. Затем в реакционную смесь добавляли 1/100 объема 1 М NaCNBH₃/H₂O. Для обеспечения связывания mPEG2-ru-ButyrALD с IL-15 посредством связи вторичного амина реакционный раствор помещали в RotoMixer при 4°C на 17 ч, а затем гасили раствором глицина. Поскольку реакцию пегилирования проводили при кислотном pH, присоединение производного PEG к IL-15 было более селективным на N-конце. Для очистки конъюгата также разрабатывали способ анионообменной хроматографии с использованием колонки Q Sepharose High Performance и натрий-фосфатных буферов. Очищенный конъюгат моно-PEG2-ru-ButyrALD-40K-IL-15 охарактеризовывали с помощью HPLC и SDS-PAGE.

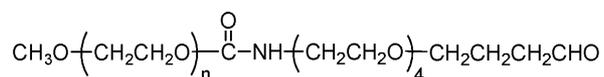
Для остальной части примеров и в прилагаемом описании очищенный [моно-PEG2-RU-ButryALD-40K]-IL-15, т.е. содержащий один фрагмент PEG со структурой, показанной выше, ковалентно присоединенный к IL-15 посредством связи через амин, будет упоминаться как конъюгат 3.

С применением того же подхода получали конъюгаты с использованием PEG2-RU-ButryALD с другими средневесовыми молекулярными массами. Например, моно-PEG2-RU-ButryALD-20K]-IL-15 получали, как описано выше, с использованием полимерного реагента массой 20 кДа (называемого в данном документе конъюгатом 4).

Пример 4. Получение длительно действующего агониста рецептора IL-15 моно-mPEG-ButyrALD-40K-IL-15



Реагент PEG, представляющий собой линейный mPEG-бутиральдегид, 40 кДа ("mPEG-ButyrALD") со структурой



использовали для получения заявляемого длительно действующего агониста рецептора IL-15, при этом средневесовая молекулярная масса реагента PEG, используемого для получения агониста, составляла приблизительно 40000 Да.

2,7 мл IL-15 (1,23 мг/мл в буфере PBS, pH 7,4) переносили в небольшой реакционный сосуд, добавляли 0,3 мл 1 М натрий-ацетатного буфера (pH 5) для доведения pH до pH 6. mPEG-ButyrALD, 40 кДа, хранившийся при -20°C под азотом, нагревали до окружающей температуры. Десятикратный избыток (относительно количества IL-15) mPEG-ButyrALD растворяли в MilliQ H₂O с получением 10% раствора реагента. 10% раствор реагента быстро добавляли в раствор IL-15, и хорошо смешивали, и помещали в RotoMixer на 15 мин. Затем в реакционную смесь добавляли 1/100 объема 1 М NaCNBH₃/H₂O. Для обеспечения связывания mPEG-ButyrALD с IL-15 посредством связи вторичного амина реакционный раствор помещали в RotoMixer при 4°C на 17 ч, а затем гасили раствором глицина. Поскольку реакцию пегилирования проводили при кислотном pH, присоединение производного PEG к IL-15 было более селективным на N-конце. Для очистки конъюгата также разрабатывали способ анионообменной хроматографии с использованием колонки Q Sepharose High Performance и натрий-фосфатных буферов. Очищенный конъюгат моно-mPEG-ButyrALD-40K-IL-15 охарактеризовывали с помощью HPLC и SDS-PAGE.

В остальных примерах моно-mPEG-ButryALD-40k-IL-15 будет обозначаться как конъюгат 5.

Пример 5. Оценивание проявления длительно действующими агонистами рецептора IL-15 смещенной активности в отношении рецептора для IL-15R α

Показатели аффинности иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (тестируемых изделий) для рецептора IL-15 α измеряли и сравнивали с показателями для IL-15. Аффинность измеряли с помощью VIAcore с использованием IL-15R α :Fc, захваченного иммобилизованным антителом к Fc.

Тестируемые изделия разбавляли до 10 мкМ в PBS (содержащем 0,05% Tween 20 и 0,1 мг/мл BSA). Получали серии 3-кратных разбавлений и инъецировали в сенсорный чип, который был покрыт IL-15R α .

Аффинности измеряли путем определения скоростей k_a и k_d отдельно, и отношение k_d к k_a использовали для вычисления значений K_D .

Предпочтительными конъюгатами, как правило, являются те, которые сохраняют настолько большую аффинность по отношению к IL-15-R α , насколько это возможно, после пегилирования по сравнению с немодифицированным IL-15. Другими словами, предпочтительными конъюгатами, как правило, являются те, аффинность которых по отношению к IL-15-R α снижена в самой меньшей степени по сравнению с немодифицированным IL-15.

Например, в некоторых вариантах осуществления предпочтительный конъюгат демонстрирует не более чем приблизительно 7-кратное снижение значения EC₅₀ (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) и не более чем приблизительно 50% снижение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) по сравнению с IL-15. Например, конъюгат 1 характеризуется приблизительно двукратным снижением эффективности по сравнению с IL-15 и сохраняет приблизительно 80% аффинности в отношении альфа рецептора по сравнению с IL-15.

Таблица 2А

Тестируемое изделие	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (пМ)
IL-15	5,78×10 ⁵	1,49×10 ⁻⁴	258
Конъюгат 1	4,92×10 ⁵	1,03×10 ⁻⁴	209

Как показано в приведенной выше таблице, конъюгат 1 сохраняет свою высокую аффинность в отношении рецептора IL-15 α (т.е. по сравнению с IL-15), что является характеристикой, которая особенно предпочтительна для длительно действующего агониста рецептора IL-15. Константы аффинности (K_D) (в пМ) приведены для дополнительных конъюгатов ниже.

Таблица 2В. Дополнительные характеристики иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15

Тестируемое изделие	EC ₅₀ (нг/мл)	IL-15R α	PK (MRT), ч.
	CTLL-2	K_D (пМ)	
	pSTAT5		
IL-15	0,27	258	
Конъюгат 1	0,62	201/209	21
Конъюгат 3	16,80	411	30
Конъюгат 4	6,21	215	
Конъюгат 5	1,45	144	25

Пример 6. In vivo исследование: исследование PK однократной дозы у мышей

Мышам C57BL/6 (n=3/группа) внутривенно вводили однократную дозу IL-15 (контроль) в количестве 0,3 мг/кг или конъюгат 2 в дозе 0,3 мг/кг. После введения собирали образцы крови в разные моменты времени после введения (24, 48, 78, 96 ч). Образцы объединяли и оценивали в ходе фармакодинамического анализа воздействия лекарственного средства на популяции лимфоцитов с помощью проточной цитометрии, причем результаты выражали как кратность изменения относительно контроля, представляющего собой среду-носитель (результаты описаны в приведенных ниже следующих примерах). В дополнение к изменениям количества клеток количественно определяли функциональные маркеры и маркеры активности. Наконец, в каждый момент времени определяли концентрацию лекарственного средства в плазме крови (см. фиг. 6).

Как показано на фиг. 6, конъюгат 2 поддерживал поддающиеся измерению концентрации в плазме крови в течение продолжительного периода времени, например, в течение более 1 недели (закрашенные квадраты), при T_{1/2} от приблизительно 20 до 30 ч, в отличие от быстрого падения уровней в плазме крови, наблюдаемых после введения для IL-15, не характеризующегося длительным действием (закрашенные кружки).

Пример 7. In vivo исследование: исследование PK однократной дозы у крыс

Крысам (n=3/группа) внутривенно вводили однократную дозу конъюгата 2 в дозировках 0,3, 0,15 и 0,075 мг/кг или однократную дозу конъюгата 2 в количестве 0,15 мг/кг подкожно. После введения собирали кровь в дни 1-7 после введения (при этом несколько образцов собирали на протяжении первых 24 ч после введения). В каждый момент времени определяли концентрацию лекарственного средства в плазме крови (см. фиг. 7).

Как показано на фиг. 7 и аналогично результатам, показанным на фиг. 6 для мышей, введение конъюгата 2 приводило к продолжительному и пропорциональному дозе воздействию лекарственного средства.

Пример 8. *In vivo* исследование передачи сигнала IL-15 у мышей

Мышам вводили дозу, как описано в примере 6 выше, для оценивания передачи сигнала *in vivo*, что оценивали по степени фосфорилирования STAT5. Степень фосфорилирования STAT5 в различных лимфоцитах (CD4, CD8 и NK-клетках) оценивали путем окрашивания цельной крови в отношении поверхностных маркеров лейкоцитов и pSTAT5 с последующим измерением с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на фиг. 8А и 8В для IL-15 и для конъюгата 2 соответственно.

Фосфорилирование STAT5 представляет собой раннее и кратковременное событие в передаче сигнала рецептором IL-15/IL-2. Как видно на фиг. 8А, хотя *in vivo* активность передачи сигнала является чрезвычайно кратковременной для IL-15, иллюстративный конъюгат 2 индуцирует длительное фосфорилирование STAT5, которое наиболее заметно в NK-клетках (перевернутые закрашенные треугольники ▼) и в CD8 клетках (нормальные закрашенные треугольники ▲) также, причем подающаяся измерению активность фосфорилирования STAT5 отмечалась в NK-клетках и CD8 клетках после 72 ч. Также показана активность фосфорилирования STAT5 для CD4 клеток (закрашенные квадраты ■).

Пример 9. *In vivo* исследование передачи сигнала IL-15 у отличных от человека приматов

В исследовании с использованием яванских макаков (супо) одной самке и одному самцу внутривенно вводили однократную дозу конъюгата 2 (0,5 мг/кг). Отбирали серии образцов крови у каждого животного как до обработки (день -6 и -1), так и с несколькими интервалами после обработки для оценивания с помощью проточной цитометрии фосфорилирования STAT5 в различных типах лимфоцитов (CD4, CD8 и NK-клетках). Результаты представлены на фиг. 9А (CD4), 9В (CD8) и 9С (NK).

Как показано на фиг. 9А-9С, результаты подобны наблюдаемым у мышей (пример 7), хотя у отличных от человека приматов фосфорилирование STAT5 наблюдали также в CD4 клетках (фиг. 9А). Фосфорилирование STAT5 в каждом из трех типов клеток существенно усиливалось после введения, достигая максимального уровня между приблизительно 3 и 4 днями после введения иллюстративного длительно действующего агониста IL-15 и возвращаясь к уровням, близким к таковым в день -1 (т.е. до введения дозы) к приблизительно дням 5-10. Аналогично примеру 7 данные результаты указывают на длительное присутствие активных молекул IL-15.

Пример 10. *In vitro* активность IL-15 иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 в NK-клеточных субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC)

Оценку активности *in vitro* иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (например, конъюгатов 1, 3 и 5) осуществляли путем исследования передачи сигналов в NK-клеточных субпопуляциях PBMC человека, как показано на фиг. 10А (CD56bright клетки) и 10В (CD56dim клетки). Фосфорилирование STAT5 оценивали так, как было описано ранее для оценки активности в отношении передачи сигнала IL-15, проявляемой длительно действующими агонистами рецептора IL-15.

Таблица 3

Соединение	EC50 (нг/мл) pSTAT5 CD56bright NK
IL-15	0,4
Конъюгат 1	2,4
Конъюгат 3	69,76
Конъюгат 5	32,26

Результаты показаны на фиг. 10А (CD56bright) и 10В (CD56dim).

Как можно видеть, каждый из иллюстративных конъюгатов индуцирует передачу сигнала IL-15 в huPBMC, тогда как конъюгат 1 эффективно индуцирует такую передачу сигнала. Из протестированных конъюгатов (показаны не все данные) конъюгат 1 демонстрировал самую высокую эффективность/активность в отношении huPBMC. Данные показывают, что даже при поддержании одинаковой степени пегилирования (т.е. количества фрагментов PEG) и одинакового размера фрагментов PEG в белке IL-15 разные архитектуры и линкеры PEG могут вызывать очень разные эффекты в отношении биоактивности в полученных конъюгатах.

Второе исследование проводили для изучения/сравнения ответа pStat5 в человеческих PBMC, полученных от двух доноров (CD3, CD4, CD8, CD56 (bright и dim), и CD4-регуляторных Т-клетках (CD25+Foxp3+)) на IL-15, конъюгат 1 и конъюгат 5. Ответ на дозу по 11 точкам исследовали с использованием 10-кратного разведения при диапазоне доз 0,001-10000 нг/мл и 20-минутной стимуляции. Каждое из тестируемых изделий разводили в буфере для IL-15+0,1% BSA. Результаты представлены в следующих таблицах.

Таблица 4. %pSTAT5 и pSTAT5 MFI в CD3 и CD4 клетках

Соединение	EC50 (нг/мл) – %pSTAT5				EC50 (нг/мл) – MFI			
	CD3		CD4		CD3		CD4	
	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2
IL-15	0,17	0,17	0,177	0,20	4,0	5,22	3,6	5,8
Конъюгат 1	0,75	1,1	0,75	0,83	22,1	108,8	23,54	106,5
Конъюгат 5	1,3	1,7	1,3	1,14	84,73	154,2	84,21	98,18

Исходя из данных в табл. 3 выше, IL-15, по-видимому, приблизительно в 4-6 раз более эффективен, чем конъюгат 1 в отношении индуцирования как CD3, так и CD4; эффективности конъюгата 1 и конъюгата 5, по-видимому, одинаковы в отношении индуцирования CD3 и CD4.

Таблица 5. %pSTAT5 и pSTAT5 MFI в CD4-регуляторных Т-клетках и CD8 клетках

Соединение	EC50 (нг/мл) – %pSTAT5				EC50 (нг/мл) – MFI			
	Регуляторные Т-клетки		CD8		Регуляторные Т-клетки		CD8	
	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2
IL-15	0,08	0,084	0,17	0,15	0,6	0,71	3,5	5,5
Конъюгат 1	0,23	0,37	0,76	1,54	2,5	2,9	16,73	99,76
Конъюгат 5	0,44	0,45	1,4	2,5	3,5	5,4	53,7	204,6

Исходя из данных в табл. 5 выше, IL-15, по-видимому, примерно в 3-5 раз более эффективен, чем конъюгат 1 в отношении индуцирования регуляторных Т-клеток и CD8; эффективности конъюгата 1 и конъюгата 5, по-видимому, по сути одинаковы в отношении индуцирования CD4 и CD8.

Таблица 6. %pSTAT5 и pSTAT5 MFI в CD56bright и CD56dim клетках

Соединение	EC50 (нг/мл) – %pSTAT5				EC50 (нг/мл) – MFI			
	CD56bright		CD56dim		CD56bright		CD56dim	
	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2	донор 1	донор 2
IL-15	0,11	0,19	0,26	0,54	0,49	0,96	1,4	3,7
Конъюгат 1	1,4	1,9	2,9	5,9	7,8	12,4	23,25	73,05
Конъюгат 5	5,1	4,5	16,48	27,12	24,86	56,9	97,51	283,4

На основании данных в табл. 6, IL-15, по-видимому, в ~10 раз более эффективен, чем конъюгат 1 в отношении индуцирования CD56. Однако, конъюгат 1, по-видимому, более эффективен, чем конъюгат 5 в индуцировании CD56bright и CD56dim.

Исходя из предыдущих данных, IL-15, конъюгат 1 и конъюгат 5 продемонстрировали схожее индуцирование pSTAT5 во всех клеточных популяциях, при этом максимальный ответ, по-видимому, является более высоким в отношении CD56bright и регуляторных Т-клеток.

Таблица 7. Сводная таблица

Соединение	EC50 (нг/мл) – %pSTAT5					
	CD3	CD4	Регуляторные Т-клетки	CD8	CD56bright	CD56dim
IL-15	0,17	0,177	0,08	0,17	0,11	0,26
Конъюгат 1	0,75	0,75	0,23	0,76	1,4	2,9
Конъюгат 5	1,3	1,3	0,44	1,4	5,1	16,48

Исходя из указанных выше данных, IL-15 является в примерно 3-4 раза более эффективным, чем конъюгат 1 и в примерно 5-8 раз более эффективным, чем конъюгат 5 в отношении индуцирования CD3, CD4, CD8 и регуляторных Т-клеток, тогда как IL-15 является в примерно 12 раз более эффективным, чем конъюгат 1 и в примерно 40-60 раз более эффективным, чем конъюгат 5 в индуцировании CD56bright и CD56dim клеток, что указывает на некоторые непредвиденные и особенно полезные характеристики конъюгата 1.

Пример 11. In vivo исследование: исследование PD однократной дозы у мышей - пролиферация и активация клеток

Мышам Balb/c (n=3/группа) внутривенно вводили однократную дозу среды-носителя (50 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 10% сахарозы, pH 7,4) или конъюгата 1 в размерах дозы 0,03 мг/кг (фиг. 11, низкая доза), 0,3 мг/кг (фиг. 11, средняя доза) или 1 мг/кг (фиг. 11, высокая доза). После введения собирали образцы крови в разные моменты времени после введения (24, 48, 78, 96, 120 ч). Образцы от каждой мыши подвергали фармакодинамическому анализу действия лекарственного средства в отношении популяций лимфоцитов с помощью проточной цитометрии. В дополнение к изменениям количества клеток исследовали функциональные маркеры и маркеры активности.

Дополнительные введения конъюгата 1 осуществляли в дозах 0,01, 0,1 и 1,5 мг/кг.

Результаты, иллюстрирующие пролиферацию NK-клеток у мышей, которым вводили каждую из доз, составляющих 0,03 мг/кг (фиг. 11, низкая доза), 0,3 мг/кг (фиг. 11, средняя доза) и 1 мг/кг (фиг. 11, высокая доза) конъюгата 1, представлены на фиг. 11А и 11В.

NK-клетки и их пролиферацию определяли с использованием комбинаций маркеров CD45+CD3-CD49b+ и CD45+CD3-CD49b+Ki67+. После введения дозы образцы крови исследовали на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FACS DIVA. Для анализа использовали программное обеспечение Flowjo, и абсолютные значения NK-клеток и % положительности в отношении Ki67 для NK-клеток наносили на график с использованием Prism.

Фиг. 11А представляет собой график экспрессии Ki67 (в процентном отношении) в течение времени; на фиг. 11В представлены количества NK-клеток в течение времени. Графики иллюстрируют способность конъюгата 1 индуцировать устойчивую пролиферацию NK-клеток у мышей.

Эффект иллюстративных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 исследовали на NK-клетках всех уровней зрелости. Пул периферических NK-клеток может быть определен по экспрессии CD27, при этом CD27^{low} NK-клетки являются более цитотоксичными и продуцируют больше цитокинов, чем CD27^{high} NK-клетки (Nayakawa Y, et al., J Immunol. 2006; 176:1517-1524). Популяции зрелых периферических NK-клеток были дополнительно классифицированы по четырем стадиям созревания, определяемым по последовательной активации экспрессии CD11b с последующей понижающей регуляцией CD27, при этом наиболее незрелыми NK-клетками являются CD27-CD11b-, а наиболее зрелыми NK-клетками являются CD27-D11b+ (Chiossone L., et al., Blood, 2009; 113:5488-5496).

У мышей четыре различных стадии созревания NK-клеток определяли по экспрессии CD27 и CD11b. После того, как идентифицировали трижды позитивные клетки в отношении маркера NK (CD49b+), природного активирующего рецептора NK (NKp46+) и IL-15/IL-2RB (CD122+), незрелые (CD11b-CD27-), ранние (CD11b-CD27+), высокоэффекторные (CD11b+CD27+) и терминальные эффекторные (CD11b+CD27-) NK-клетки количественно определяли с помощью проточной цитометрии.

NK-клетки, находящиеся на различных стадиях созревания, количественно определяли у мышей, получавших однократную дозу, или после получения ими третьей дозы согласно схеме q7dx3, конъюгата 1 в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 и 1,5 мг/кг, как описано выше. С использованием проточной цитометрии представляющую интерес популяцию NK идентифицировали по положительности в отношении CD49b, NKp46 и CD122. Затем CD11b и CD27 использовали для дальнейшей дифференциации популяции NK на субпопуляции незрелых (CD11b-CD27-), ранних (CD11b-CD27+), высокоэффекторных (CD11b+CD27+) и терминальных эффекторных (CD11b+CD27-) клеток. Периферическую кровь анализировали с помощью проточного цитометра Fortessa, и абсолютные значения для каждой популяции определяли с помощью счетных гранул во время отбора образцов с использованием программного обеспечения BD FACS DIVA. Анализ путем проточной цитометрии проводили с использованием программного обеспечения Flowjo, и данные наносили на график в Prism.

Результаты показаны на фиг. 12A-D. Дополнительные результаты показаны на фиг. 22A-D. Результаты для q7dx3 показаны на фиг. 28A-D. Как видно из графиков, конъюгат 1 являлся эффективным в отношении увеличения количества NK-клеток всех уровней зрелости (терминальные эффекторные клетки, предшественники NK-клеток, высокоэффекторные клетки и ранние NK-клетки). Наблюдали зависимое от дозы увеличение количества NK-клеток в субпопуляциях всех стадий созревания, при этом данный эффект длился в течение по меньшей мере 120 ч.

Определение поверхностной экспрессии NKG2D проводили с использованием анализа проточной цитометрии сигнала антител к NKG2D, выраженного в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) в NK-клетках. Подобным образом, уровень внутриклеточного гранзима В определяли с использованием проточной цитометрии для выявления сигнала антитела против гранзима В, также выраженного как MFI в NK-клетках. После выявления сигнала NKG2D и гранзима В с использованием проточного цитометра Fortessa и программного обеспечения FACS Diva анализ проводили с использованием программного обеспечения Flowjo. Значения MFI наносили на график с использованием Prism. Результаты показаны на фиг. 13A и 13B, которые дополнительно иллюстрируют способность конъюгата 1 усиливать активацию NK-клеток, о чем свидетельствует его способность обеспечивать устойчивое усиление экспрессии как NKG2D, так и гранзима В (проапоптотической сериновой протеазы) NK-клетками по сравнению со средой-носителем, что наиболее заметно для средних и высоких размеров доз. Дозозависимое увеличение обоих маркеров активации NK наблюдали после однократной дозы конъюгата 1.

У мышей CD8 Т-клетки определяли как CD45+CD3+CD4-CD8+. Кровь и селезенку мышей подвергали иммунофенотипированию с использованием проточного цитометра Fortessa и анализу с использованием программного обеспечения Flowjo. Абсолютные количества CD8 клеток наносили на график в Prism, как показано на фиг. 14 (кровь) и фиг. 24 (селезенка). На фиг. 14 и 24 проиллюстрирована способность конъюгата 1 индуцировать пролиферацию и устойчивое увеличение количества CD8 Т-клеток после однократного i.v. введения у мышей при каждом из дозированных количеств, описанных выше. Воздействие наиболее заметно для средних (0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг) и высоких (1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг) дозированных количеств.

У мышей CD8 эффекторные Т-клетки памяти (T_{em}) и CD8 центральные Т-клетки памяти (T_{cm}) идентифицировали как CD45+CD3+CD4-CD8+CD44+CD62- и CD45+CD3+CD4-CD8+CD44+CD62L+. Пролиферацию этих популяций Т-клеток памяти определяли с использованием положительности в отношении Ki-67. После однократной дозы конъюгата 1 или IL-15 кровь и селезенку подвергали иммунофенотипированию с использованием проточного цитометра Fortessa, программного обеспечения для сбора данных DIVA и программного обеспечения для анализа Flowjo. Графики строили в Prism. Конъюгат 1 индуцирует зависимое от дозы увеличение как CD8 эффекторных Т-клеток памяти, так и центральных CD8 Т-клеток памяти, тогда как однократная доза IL-15 к данному индуцированию не приводит, как показано на фиг. 15A и 15B для крови. Конъюгат 1 индуцирует зависимое от дозы увеличение как Ki67, так и гранзима В, тогда как однократная доза IL-15 к данному индуцированию не приводит, как показано на фиг. 25 и 26 для селезенки. Популяции как эффекторных, так и центральных клеток памяти пролиферируют в ответ на введение конъюгата 1, представляющего собой иллюстративный длительно действующий агонист IL-15.

Пример 12. In vivo исследование: исследование PD однократной дозы у отличных человека приматов

В исследовании с использованием яванских макаков одной самке и одному самцу внутривенно вводили 500 мкг/кг конъюгата 2. Отбирали серии образцов крови у каждого животного до обработки (день -6 и -1) и с несколькими интервалами после обработки однократной дозой для оценивания с помощью проточной цитометрии количества лимфоцитов (NK-клеток, CD8 Т-клеток и т.д.) и активации.

Количества NK-клеток определяли для оценки способности иллюстративного конъюгата 2 индуцировать устойчивую пролиферацию NK-клеток у отличных от человека приматов; результаты показаны на фиг. 16A и 16B. NK-клетки и их пролиферацию в крови яванского макака идентифицировали с помощью проточной цитометрии. Сбор и анализ NK-клеток (CD45+CD3-CD16+) и их статуса пролиферации (CD45+CD3-CD16+Ki67+) проводили с использованием программного обеспечения BD FACS DIVA. Абсолютные значения для NK-клеток и пролиферирующих NK-клеток использовали для расчета % положительности в отношении Ki67 в популяции NK. Значения, полученные до и после обработки, наносили на график с использованием Prism.

Как показано в данном документе, введение однократной дозы конъюгата 2 являлось эффективным в отношении индуцирования устойчивой пролиферации NK-клеток у отличных от человека приматов.

Количества CD8 Т-клеток также определяли, как показано на фиг. 17, для каждого животного в промежутке от периода до введения дозы до 14 дней после введения. В частности, CD8 Т-клетки определяли как CD45+CD3+CD4-CD8+. Кровь от обезьян также подвергали иммунофенотипированию, как описано ранее. У обезьян количество CD8 Т-клеток увеличивалось устойчивым образом, при этом эффект длился по меньшей мере 10 дней. Представленный график дополнительно иллюстрирует способность иллюстративного длительно действующего агониста рецептора IL-15, представляющего собой конъюгат 2, индуцировать пролиферацию и устойчивое увеличение количества CD8 Т-клеток после введения.

У обезьян CD8 T_{EM}-клетки определяли как CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra-CD197-, а CD8 T_{CM} определяли как CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra-CD197+. Иммунофенотипирование проводили с помощью проточной цитометрии с получением данных в отношении образцов с помощью программного обеспечения DIVA и анализом данных с помощью программного обеспечения Flowjo. Графики строили с использованием Prism. Количество CD8 эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}-клеток) и CD8 центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) определяли для каждого животного в интервале от периода до введения дозы до 14 дней после введения, как показано на фиг. 18А и В соответственно. Конъюгат 2 индуцирует значительное и устойчивое увеличение популяций CD8 эффекторных и центральных Т-клеток памяти у яванских макаков. На фигурах показано, что популяции как CD8 эффекторных, так и центральных Т-клеток памяти пролиферируют в ответ на иллюстративный конъюгат 2.

Пример 13. Оценивание противоопухолевой активности в модели индуцированной с помощью СТ26 подкожной метастатической опухоли легкого у мышей Balb/c

В день 0 самкам мышей Balb/c возрастом 6-8 недель инокулировали 1×10^5 мышинных СТ-26 клеток путем инъекции в хвостовую вену. В день 1 через 24 ч после введения клеток СТ-26 мышей делили на десять групп. Каждая группа состояла из 6-9 животных (для конъюгата 2) или 9-12 животных (для конъюгата 1). (Два отдельных исследования проводили для введения конъюгата 1 и конъюгата 2, хотя протокол исследования по существу был одинаковым в обоих исследованиях). Каждой группе назначали следующее одно вмешательство: среда-носитель, представляющая собой забуференный фосфатом солевой раствор (группа А); нативный IL-15 отдельно (группа В); конъюгат 2 в дозе 0,03 мг/кг (группа С); конъюгат 2 в дозе 0,1 мг/кг (группа D); конъюгат 2 в дозе 0,3 мг/кг (группа E); конъюгат 2 в дозе 1,0 мг/кг (группа F); конъюгат 2 в дозе 3,0 мг/кг (группа G); для конъюгата 1: среда-носитель, представляющая собой забуференный фосфатом солевой раствор (группа H); конъюгат 1 в дозе 0,03 мг/кг (группа I) и конъюгат 1 в дозе 0,3 мг/кг (группа J). Животным вводили дозы в дни 1, 5 и 10.

Через 13 дней после даты введения опухолевых клеток СТ-26 мышей анестезировали и собирали клетки крови и селезенки для дальнейшего анализа маркеров иммунофенотипа, при этом легкие фиксировали в течение 24-48 ч в растворе Буэна, содержащем пикриновую кислоту и формальдегид.

Количество опухолевых узлов в легком подсчитывали при препарировании для каждого легкого, и определяли среднее число узлов в легком для каждой группы. Статистическую значимость также определяли при сравнении получавшей среду-носитель группы с экспериментальными группами с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Результаты метастазирования в легких показаны на фиг. 19 и 20 для групп обработки, соответствующих конъюгату 2 и конъюгату 1 соответственно. В то время как оба иллюстративных длительно действующих агониста рецептора IL-15 были эффективными в стимулировании снижения метастазов в легких, конъюгат 2 обеспечивал снижение метастазов на 65% по сравнению со средой-носителем, тогда как конъюгат 1 обеспечивал снижение метастазов на 85%.

Кровь и спленоциты анализировали в день 13 на предмет изменений иммунофенотипических маркеров с использованием проточной цитометрии и маркерных антител, конъюгированных с различными флуорохромами. Конъюгат 2, вводимый в количестве 0,3, 1 и 3 мг/кг, индуцировал зависимое от дозы повышение CD8 Т-клеток в 1,5, 2,5 и 3,3 раза по сравнению со средой-носителем в крови соответственно. Аналогичные наблюдения получали в отношении селезенки с повышением в 1,3, 1,7 и 2,2 раза при уровнях дозы 0,3, 1 и 3 мг/кг по сравнению со средой-носителем. Иммунофенотипирование Ki-67 выявило значительные зависимые от дозы увеличения пролиферации CD8 Т-клеток в крови с 1,7-, 4,6- и 5,3-кратными изменениями и в селезенке с 2,5-, 5,7- и 6,9-кратными изменениями при одинаковых уровнях низкой, средней и высокой дозы по сравнению со средой-носителем. Кроме того, обработка конъюгатом 2 увеличивала MFI способствующего выживанию Vcl-2+ в CD8 в 1,5 раза как в крови, так и в селезенке.

Таблица 8

Группа	Тестируемое изделие	Доза (мг/кг)	Схема	Путь	Число животных
A	Контроль со средой-носителем		однократная	i.v.	6
B	IL-15	0,3	дни 1, 5 и 10	i.v.	9
C	Конъюгат 2	0,03	дни 1, 5 и 10	i.v.	8
D	Конъюгат 2	0,1	дни 1, 5 и 10	i.v.	8
E	Конъюгат 2	0,3	дни 1, 5 и 10	i.v.	9
F	Конъюгат 2	1,0	дни 1, 5 и 10	i.v.	9
G	Конъюгат 2	3,0	дни 1, 5 и 10	i.v.	9
H	Контроль со средой-носителем		однократная	i.v.	9
I	Конъюгат 1	0,03	дни 1, 5 и 10	i.v.	12
J	Конъюгат 1	0,3	дни 1 и 5 (только две дозы)	i.v.	9

Пример 14. In vitro и in vivo цитотоксичность НК-клеток после обработки конъюгатом 1

Опосредованную НК-клетками цитотоксичность в отношении целевых опухолевых клеток оценивали in vitro с использованием анализа на основе проточной цитометрии. НК-клетки выделяли из селезенки мышей Balb/c с использованием выделения путем магнитного негативного отбора клеток (набор для обогащения НК-клеток мыши, Stemcell Technologies) и использовали в качестве эффекторных клеток. Для in vitro исследований выделенные НК-клетки стимулировали конъюгатом 1 в концентрациях 3000, 1000, 300, 30, 3 или 0 (нестимулированные) нг/мл в течение ночи в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ перед использованием, в анализе цитотоксичности. Для in vivo исследований мышам вводили дозу 0,3 мг/кг конъюгата 1, и НК-клетки селезенки выделяли через 24, 48 и 72 ч после введения дозы и использовали непосредственно в анализе цитотоксичности.

T-клетки YAC-1, меченые PKN26, использовали в качестве целевых клеток. Для мониторинга цитотоксичности НК-клеток НК-клетки и клетки YAC-1 совместно культивировали при различных соотношениях эффектор:мишень (50:1, 25:1 и 12,5:1) в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂, затем окрашивали с помощью 7-AAD в течение 10 мин для мечения мертвых клеток. Клетки сразу же анализировали с использованием проточной цитометрии. Лизированные целевые клетки идентифицировали как PKN26⁺7-AAD⁺.

In vitro результаты. После совместного культивирования в течение 4 ч цитотоксичность оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 21.

In vivo результаты. После обработки при 0,3 мг/кг цитотоксичность оценивали через 24, 48 и 72 ч. Результаты представлены на фиг. 27.

Эти данные иллюстрируют зависимую от дозы усиленную цитотоксичность НК-клеток in vitro и in vivo после обработки конъюгатом 1.

Пример 15. Индуцирование гранзима В конъюгатом 1

Экспрессию гранзима В НК-клетками как функцию времени измеряли после обработки конъюгатом 1 в дозах 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 1,5 мг/кг. Цельную собирали кровь в период от 24 до 240 ч после введения дозы для иммунофенотипирования. После лизиса красных кровяных клеток лейкоциты метили красителем для определения жизнеспособности и маркерами, специфичными в отношении CD45, CD3 и CD49b, для идентификации живых НК-клеток. Затем клетки одновременно фиксировали и пермеабелизировали для внутриклеточного окрашивания гранзима В. Окрашенную кровь анализировали на проточном цитометре Fortessa, данные получали с помощью программного обеспечения DIVA, и анализ проводили с использованием программного обеспечения Flowjo. Данные представлены в виде процента НК-клеток, которые были положительными в отношении экспрессии гранзима В.

Результаты представлены на фиг. 23. Эти данные указывают на то, что обработка конъюгатом 1 обеспечивает увеличение уровня экспрессии гранзима В в НК-клетках.

Пример 16. In vivo исследование: исследование ПК однократной дозы IL-15 и конъюгата 1 и передачи сигнала JAK/STAT у мышей

Для анализа ПК конъюгат 1 вводили в виде однократной внутривенной дозы 0,3 мг/кг мышам balb/c (n=3). После введения мышам гуманно умерщвляли и собирали плазму через 24, 48, 72, 96, 120 и 144 ч после обработки. В отдельном исследовании мышам внутривенно вводили однократную дозу IL-15 (0,5 мг/кг). Образцы от этих мышей собирали в указанные моменты времени в течение 6 ч после обработки.

[Способы определения РК ранее описаны в данном документе]. Для фармакодинамического исследования мышам balb/c ($n = 1$ /группа) делали i.v. инъекцию конъюгата 1 в количестве 0,03 или 0,3 мг/кг или среду-носитель (50 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 10% сахарозы, рН 7,4) и кровь собирали до введения дозы и через 15 мин, 1, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после обработки. Образцы анализировали индивидуально с помощью проточной цитометрии и выражали как процент положительности в отношении pSTAT5 в CD8 и NK-клетках.

Фиг. 29А представляет собой график, демонстрирующий концентрацию тестируемого изделия (IL-15 или конъюгата 1) в плазме крови у мышей balb/c в течение периода времени, составляющего 144 ч после введения однократной внутривенной дозы тестируемых изделий в дозах 0,5 и 0,3 мг/кг соответственно.

Результаты. Конъюгат 1 характеризуется периодом полувыведения, составляющим примерно 12 ч, тогда как IL-15 быстро выводится из плазмы крови, характеризуясь периодом полувыведения, составляющим менее 1 ч.

Фиг. 29В представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении pSTAT5 в CD8 Т-клетках у мышей после однократной инъекции конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг.

Результаты. Конъюгат 1 при обоих уровнях дозы индуцирует устойчивую передачу сигнала pSTAT5 в CD8 Т-клетках. Показан 120-часовой период времени, в том числе перед введением дозы.

Фиг. 29С представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении pSTAT5 в NK-клетках мыши после однократной инъекции конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг.

Результаты. Конъюгат 1 при обоих уровнях дозы индуцирует сильную и устойчивую передачу сигнала pSTAT5 в NK-клетках.

Пример 17. In vivo исследование фармакодинамики у мышей с однократной дозой и Q7dx3 - количества и пролиферация клеток

Мышам balb/c ($n=3$ /группа) вводили однократную дозу или три еженедельные дозы конъюгата 1 в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 1,5 мг/кг или среды-носителя. Мышей умерщвляли и собирали кровь в различные моменты времени после введения (через 24, 48, 72, 96, 120, 144, 240 ч). Образцы от каждой мыши подвергали анализу проточной цитометрии для изучения фармакодинамических эффектов в популяциях лимфоцитов и представляющего интерес функционального маркера (количества CD8 Т-клеток, CD8 Т-клеток памяти и NK-клеток и процент положительности в отношении Ki-67 в каждой популяции). Результаты показаны на фиг. 30А-Е, 31А-С и 32А-С.

Фиг. 30А-С представляют собой графики общих количеств CD8 клеток, CD8 центральных клеток памяти (T_{cm}) и CD8 эффекторных клеток памяти (T_{em}) соответственно после однократного введения конъюгата 1 в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 1,5 мг/кг, как описано в примере 17. Конъюгат 1 при уровнях дозы, равных или превышающих 0,03, индуцирует значительное увеличение суммарного количества CD8 Т-клеток в крови, как описано в примере 17. Самая низкая доза 0,01 мг/кг повышала уровни CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} . При 0,3 мг/кг конъюгат 1 повышал уровни CD8, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} в 6,4 раза, 37,9 раза и 14,5 раза. Следует отметить, что количества CD8 и CD8 Т-клеток памяти не возвращались к исходному уровню через 240 ч после инъекции, когда конъюгат 1 вводили в дозах 0,3-1,5 мг/кг, что демонстрирует устойчивые PD эффекты конъюгата 1.

Фиг. 30D, 30Е и 30F представляют собой графики, демонстрирующие процент положительности в отношении Ki-67 в суммарных популяциях CD8 Т-клеток, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} соответственно у мышей, как описано в примере 17. Однократная доза конъюгата 1 при всех уровнях дозы обеспечивает увеличение положительности в отношении Ki-67 во всех CD8 Т-клетках и субпопуляциях CD8 Т-клеток.

Фиг. 31А, 31В и 31С представляют собой графики количеств CD8 Т-клеток и субпопуляции CD8 Т-клеток памяти после введения однократной дозы конъюгата 1 (точечные линии) или Q7dx3 (сплошные линии) в количестве 0,03 и 0,3 мг/кг, как описано в примере 17. Повторное введение дозы еще больше увеличивало численность данных популяций с увеличением CD8, CD8 T_{cm} , CD8 T_{em} в 35,3 раза, 183 раза и 73,8 раза соответственно. В конце данного периода времени (через 240 ч после первой или последней дозы, составляющей 0,3 мг/кг) количества клеток не возвращались к исходному уровню у мышей.

Фиг. 32А и 32В представляют собой графики количеств NK-клеток и процента положительности в отношении Ki-67 после однократной дозы конъюгата 1, составляющей от 0,01 до 1,5 мг/кг, у мышей, как описано в примере 17. Количества NK-клеток значительно превышали количества в случае применения контроля, представляющего собой среду-носитель, при всех уровнях дозы и возвращались к исходному уровню через 240 ч после введения дозы. Все уровни дозы индуцируют устойчивое увеличение процента положительности в отношении Ki-67 в NK-клетках.

Фиг. 32С представляет собой график, демонстрирующий количества NK-клеток мыши после однократного (сплошные линии) или Q7dx3 (пунктирные линии) введения конъюгата 1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг, как описано в примере 17. Повторное введение дозы конъюгата 1, составляющей 0,3 мг/кг, индуцировало немного меньшие, хотя по-прежнему значимые, количества NK-клеток по сравнению с однократной дозой. Подобные количества NK-клеток достигали при однократном введении дозы по сравнению с повторным введением дозы, составляющей 0,03 мг/кг.

Результаты. Конъюгат 1 при уровнях доз, равных или превышающих 0,03, индуцирует существен-

ное увеличение суммарного количества CD8 T-клеток в крови. Самая низкая доза 0,01 мг/кг повышала количества CD8 T_{cm} (центральных клеток памяти) и CD8 T_{em} (эффекторных клеток памяти). При 0,3 мг/кг конъюгат 1 повышал количества CD8, CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} в 6,4 раза, 37,9 раза и 14,5 раза соответственно. Следует отметить, что количества CD8 T-клеток и CD8 T-клеток памяти не возвращались к исходному уровню через 240 ч после инъекции, когда конъюгат 1 вводили в дозах 0,3-1,5 мг/кг, что демонстрирует благоприятные устойчивые PD эффекты конъюгата 1.

Пример 18. Измерение *in vitro* цитотоксичности NK-клеток у мышей, обработанных конъюгатом 1, и анализ гранзима В в NK-клетках крови

Мышей balb/c (n=2/группа) обрабатывали конъюгатом 1 (0,006, 0,03 или 0,3 мг/кг), IL-15 (1 мг/кг) или контролем со средой-носителем. После обработки выделяли селезенки через 24, 72 и 96 ч для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли способом магнитного негативного отбора и инкубировали при соотношениях NK-клеток (эффекторных) и клеток YAC-1 (целевых клеток), составляющих 12,5:1, 25:1 и 50:1 (E:T), в течение 4 ч при 37C, 5% CO₂. Целевые клетки YAC-1 предварительно метили, а затем окрашивали с помощью 7AAD после инкубации с NK-клетками. Выявление лизированных (7AAD+) целевых клеток (PKH26+) осуществляли с помощью проточной цитометрии. Кровь от данных мышей также собирали в те же моменты времени и подвергали измерениям посредством проточной цитометрии на предмет экспрессии в NK-клетках гранзима В. Результаты показаны на фиг. 33А и 33В.

На фиг. 33А проиллюстрирован *in vitro* анализ цитотоксичности NK-клеток, при котором измеряют изменения в степени NK-опосредованного лизиса целевых клеток после обработки тестируемым изделием у мышей. Показан процент специфического лизиса клеток YAC-1 NK-клетками селезенки, выделенными у мышей balb/c, обработанных 0,006, 0,03 или 0,3 мг/кг конъюгата 1 или 1 мг/кг IL-15, в указанные часы в течение периода времени. NK-клетки селезенки от мышей, которым вводили дозу среды-носителя, служили в качестве контроля.

Результаты. Конъюгат 1, введенный в дозе 0,3 мг/кг, индуцировал повышение цитотоксичности NK-клеток, превосходящее по величине и продолжительности NK-клетки от мышей, получавших однократную инъекцию IL-15 в количестве 1 мг/кг.

Фиг. 33В представляет собой график, демонстрирующий процент положительности в отношении гранзима В в NK-клетках крови от тех же мышей, используемых в анализе цитотоксичности NK-клеток *in vitro* на фиг. 33А.

Результаты. Конъюгат 1, введенный в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг, индуцировал значительное увеличение уровней экспрессии гранзима В в NK-клетках, при этом сильное и устойчивое повышение наблюдали в дозе 0,3 мг/кг.

Пример 19. Эффективность конъюгата 1 в качестве одного средства в модели индуцированного клетками СТ-26 метастатического рака легкого

Мыши balb/c получали инъекцию в хвостовую вену 1×10^5 клеток карциномы толстой кишки СТ-26. На следующий день мышей (n=9/группа) обрабатывали два раза в неделю конъюгатом 1 (0,03 или 0,3 мг/кг) или контролем со средой-носителем. Через пять дней после второй инъекции мышей гуманно умерщвляли и подсчитывали легочные узлы. Результаты показаны на фиг. 34 А и 34В.

Фиг. 34А и 34В иллюстрируют процент подавления узлов в легких у мышей balb/c, получавших внутривенно инъекцию опухолевых клеток СТ-26 с последующей обработкой конъюгатом 1, вводимый дважды с интервалом в одну неделю в количестве 0,03 или 0,3 мг/кг.

Результаты. Инъекция конъюгата 1 в количестве 0,03 и 0,3 мг/кг подавляла образование узлов в легких на 40 и 80% соответственно. За теми же мышами, которым вводили дозу 0,3 мг/кг, вели наблюдения в течение 32 дней после инъекции опухолевых клеток для оценки выживаемости. Обработка конъюгатом 1 значительно увеличивала выживаемость по сравнению с мышами, получавшими контроль, представляющий собой среду-носитель, которым инъецировали опухолевые клетки.

Пример 20. Оценивание зависимой от NK-КЛЕТОК эффективности конъюгата 2 в модели индуцированного клетками СТ-26 метастатического рака легкого

Мышам СТ-26 (n=7-11/группа) вводили инъекцию антитела к асиало-GM1 для истощения NK-клеток или два разных контроля (IgG или PBS), затем вводили инъекцию 1×10^5 опухолевых клеток СТ-26. Затем мышей обрабатывали конъюгатом 2 в дозе 0,3 мг/кг, введенной в дни 1, 5 и 10 после инъекции опухолевых клеток или контроля со средой-носителем. Мышей умерщвляли и подсчитывали легочные узлы через три дня от последнего дня обработки. Результаты показаны на фиг. 35.

Фиг. 35 представляет собой график, демонстрирующий процент подавления узлов в легких у инъецированных клетками СТ-26 мышей, обработанных конъюгатом 2, которые получали опосредованное антителами истощение NK-клеток (оливково-зеленый), контроль IgG (синий) или PBS (оранжевый). Данные представлены в виде процента подавления образования узлов в легких по сравнению с мышами, которым инъецировали СТ-26, которые не подвергали истощению по NK-клеткам и обрабатывали контролем, представляющим собой среду-носитель (черный). Эффективность конъюгата 2 в данной модели опухоли устранялась при отсутствии у мышей NK-клеток.

Пример 21. *In vivo* фармакодинамическое исследование однократной дозы конъюгата 1 у отличных

от человека приматов

В данном исследовании с использованием яванских макаков (супо) одной самке и одному самцу внутривенно вводили однократную дозу конъюгата 1 (0,1 мг/кг). Отбирали серии образцов крови у каждого животного на протяжении 14-дневного периода времени и подвергали анализу проточной цитометрии в отношении различных лимфоцитов (CD8 Т-клеток, процента положительных в отношении Ki-67 среди общего количества CD8, CD8 центральных Т-клеток памяти (T_{cm}) и CD8 эффекторных Т-клеток памяти (T_{em}), NK-клеток и процента положительных в отношении Ki-67 NK-клеток). Результаты показаны на фиг. 36А-Д и 37А-В.

Фиг. 36А и 36В представляют собой графики, иллюстрирующие двухнедельный период времени для количеств CD8 клеток и процента положительности в отношении Ki-67 как меры пролиферации у одного самца (пунктирная линия) и одной самки (сплошная линия) яванского макака после внутривенного введения конъюгата 1 в дозе 0,1 мг/кг. Как можно видеть, конъюгат 1 индуцирует значительное повышение количества CD8 Т-клеток у яванского макака с 7-10-кратным повышением количеств клеток после однократной дозы.

Фиг. 36С и 36Д иллюстрируют повышения у яванского макака количеств клеток CD8 T_{cm} и CD8 T_{em} после однократной инъекции конъюгата 1. Количества CD8 T_{cm} и T_{em} увеличивались в 27-30 раз и 21-33 раза соответственно.

Фиг. 37А и 37В представляют собой графики количеств NK-клеток и процента положительности в отношении Ki-67 у яванского макака после однократной дозы конъюгата 1 в количестве 0,1 мг/кг. Количество NK-клеток увеличивалось в 9-10 раз после обработки конъюгатом 1.

Пример 22. Сравнение *in vitro* активности IL-15 и конъюгата 1 в отношении CD8 и CD56BRIGHT NK-клеток из человеческих PBMC

Оценивание *in vitro* активности конъюгата 1 выполняли путем исследования передачи сигнала JAK/STAT в NK и CD8 после обработки человеческих PBMC с помощью IL-15 или конъюгата 1 в диапазоне доз 0,001-10000 нг/мл. Фосфорилирование STAT5 оценивали, как описано ранее.

Таблица 9

Соединение	EC50 (мг/мл) – % pSTAT5	
	CD8	CD56bright
IL-15	0,16	0,11
Соединение 1	0,87	1,7

Результаты показаны на фиг. 38А и 38В; данные фигуры представляют собой кривые EC50 для обработки IL-15 (●) по сравнению с обработкой конъюгатом 1 (■) человеческих PBMC и последующего измерения процента положительности в отношении pSTAT5 в CD8 и CD56bright NK-клетках.

Результаты. Конъюгат 1 является в 5,5 и 15 раз менее эффективным, чем IL-15 в отношении активации CD8 и CD56bright NK-клеток соответственно. Важно отметить, однако, что конъюгат 1 достигает такого же максимального ответа, как и стандартный IL-15.

Пример 23. *In vivo* исследование: исследование PK однократной дозы у мышей

Мышам *balb/c* (n=3/группа) внутривенно вводили однократную дозу IL-15 (500 мкг/кг) или конъюгата 1 в количестве 10, 30, 100, 300 и 1000 мкг/кг. Собирали образцы крови в указанные моменты времени после введения (конъюгат 1: через 24, 48, 72, 96, 120, 144, 240 ч; контроль с IL-15: через 0,03, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ч), и определяли концентрацию лекарственного средства в плазме (См. фиг. 39).

Как показано на фиг. 39, конъюгат 1 демонстрировал более продолжительные фармакокинетические эффекты, поддающиеся измерению концентрации в плазме с периодом полувыведения примерно 14 ч по сравнению с уровнями в плазме, наблюдаемыми для не характеризующегося длительным действием IL-15, который подвергался быстрому выведению.

Пример 24. *In vivo* исследование: исследование PK однократной дозы у крысы

Крысам *Sprague Dawley* (n=3) внутривенно вводили однократную дозу конъюгата 1 в количестве 10, 75 и 150 мкг/кг. Концентрацию лекарственного средства в плазме определяли в указанные моменты времени после инъекции (через 0,03, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ч). См. фиг. 40.

Как показано на фиг. 40, конъюгат 1 демонстрирует устойчивые фармакокинетические эффекты, поддающиеся измерению концентрации в плазме с периодом полувыведения примерно 18 ч по сравнению с уровнями в плазме, наблюдаемыми для не характеризующегося длительным действием IL-15, который подвергался быстрому выведению, как показано на фиг. 40.

Пример 25. *In vivo* исследование: исследование PK однократной дозы у отличных от человека приматов

Яванским макакам (n=2, 1 самец и 1 самка) внутривенно вводили однократную дозу конъюгата 1 в количестве 10, 50 и 100 мкг/кг. IL-15 вводили внутривенно в виде однократной дозы 50 мкг/кг в качестве контроля. Концентрацию лекарственного средства в плазме определяли в указанные моменты времени после инъекции (через 0,03, 0,25, 1, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ч). См. фиг. 41.

Как показано на фиг. 41, конъюгат 1 демонстрирует устойчивые фармакокинетические эффекты,

поддающиеся измерению концентрации в плазме с периодом полувыведения примерно 30 ч для дозы 100 мкг/кг по сравнению с не характеризующимся длительным действием IL-15, который подвергался быстрому выведению из плазмы крови.

Конъюгат 1 достигал более продолжительного и устойчивого показателя воздействия в плазме крови у нескольких видов (мышей, крыс и яванских макаков) после введения однократной дозы (см. фиг. 39-41).

Пример 26. In vivo исследование: исследование PD однократной дозы у мышей - количества клеток, пролиферация и активация передачи сигнала JAK/STAT

Мышам balb/c (n=3/группа) внутривенно вводили однократную дозу среды-носителя (как описано в примере 11) или конъюгата 1 в дозе 0,3 мг/кг или 0,03 мг/кг. После введения собирали образцы крови в определенные моменты времени после введения (через 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 240 ч). Образцы подвергали иммунофенотипированию в отношении количеств CD4 Т-клеток (см. фиг. 42А) и % Ki-67 (см. фиг. 42В) в указанные моменты времени.

CD4 Т-клетки и их пролиферацию определяли с помощью маркеров CD45+CD3+CD4+CD8- и CD45+CD3+CD4+CD8-Ki-67+ соответственно. Фиг. 42А представляет собой график количества CD4 Т-клеток, а фиг. 42В представляет собой график пролиферации CD4 Т-клеток, измеренной по % положительности в отношении Ki-67 с течением времени. CD4 Т-клетки были наименее чувствительной популяцией к обработке конъюгатом 1 с относительно небольшим увеличением количеств и % экспрессии Ki-67 (наблюдаемой через 72-144 ч после введения дозы) по сравнению с CD8 и NK-клетками (см., например, пример 11). NK-клетки были более чувствительны к стимуляции пролиферативных ответов посредством введения однократной дозы конъюгата 1, чем CD4 Т-клетки или CD8 Т-клетки у мышей.

Фосфорилирование STAT5 в CD4 Т-клетках определяли с использованием комбинации маркеров CD3+CD4+CD8- pSTAT5+. Фиг. 43 представляет собой график процента положительности в отношении фосфорилирования pSTAT5 в CD4 Т-клетках в течение времени (через 0,25, 1, 6, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после введения) при дозе 0,03 мг/кг (синий, закрашенные квадраты) или 0,3 мг/кг (оранжевый, закрашенные кружки). Также показаны уровни для среды-носителя в течение времени (черный) и до введения дозы (незакрашенные кружки).

Результаты. CD4 Т-клетки были наименее чувствительной популяцией к обработке конъюгатом 1 с относительно небольшим увеличением экспрессии pSTAT5 (наблюдаемой через 0,25-72 ч после введения дозы) по сравнению с CD8 и NK-клетками. NK-клетки являются более чувствительными к стимуляции однократной дозой конъюгата 1 при пролиферативных ответах по сравнению с CD8 Т-клетками или CD4 Т-клетками у мышей.

Пример 27. In vivo исследование: исследование минимальной эффективной дозы у отличных от человека приматов (NHP)

Яванским макакам (n=3-4 самцов) внутривенно вводили однократную инъекцию конъюгата 1 в количестве 0,003, 0,01, 0,1 мг/кг или контроля со средой-носителем. Образцы крови собирали в указанные моменты времени до и после введения дозы (дни -5, -2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 17) и подвергали анализу проточной цитометрии для определения фармакодинамических эффектов в популяциях лимфоцитов. Определяли количества клеток NK, CD8 Т-клеток и CD4 Т-клеток, при этом результаты показаны на фиг. 44А-С. Исследовали пролиферацию (% Ki-67) и передачу сигнала JAK/STAT (% pSTAT5) для NK-клеток, CD8 Т-клеток и CD4 Т-клеток, при этом результаты показаны на фиг. 45А-С и фиг. 46А-С соответственно. Исследовали пролиферацию (% Ki-67) субпопуляций CD8 (T_{native}, T_{em}, T_{cm} и T_{scm}), при этом результаты показаны на фиг. 47А-Д.

У NHP количество NK-клеток (CD45+CD3-CD16+) значительно увеличивалось и зависело от дозы после однократной дозы конъюгата 1. Максимальные количества клеток наблюдали через пять дней после введения дозы и были устойчивыми до 14 дней при уровнях дозы 0,1 и 0,01 мг/кг. Самый низкий уровень дозы, приводящий к значительному увеличению NK-клеток, составлял 0,01 мг/кг. Подтверждая наблюдения в отношении количеств NK-клеток, конъюгат 1 также вызывает зависимое от дозы и усиленное индуцирование экспрессии Ki-67, которая достигает максимума через примерно 3-4 дня после обработки и может поддерживаться до приблизительно 14 дней. Значительное повышение % Ki-67 может быть обнаружено после введения уровня дозы, составляющего 0,001 мг/кг. Конъюгат 1 также эффективно активирует путь передачи сигнала JAK/STAT в NK-клетках с зависимым от дозы повышением % pSTAT5, что может быть обнаружено при уровне дозы, составляющем всего 0,001 мг/кг.

Фиг. 44А, 45А и 46А представляют собой графики количеств NK-клеток, % Ki-67 и % pSTAT5 в течение времени после обработки конъюгатом 1 соответственно.

У NHP конъюгат 1 индуцирует значительное повышение общего количества CD8 Т-клеток (определенных как CD45+CD3+CD4-CD8+), при этом максимальные количества клеток достигались ближе к дню 5 после обработки. Данный эффект являлся устойчивым в течение более семи дней, возвращаясь к исходному уровню в промежутке от дня 10 до дня 14 после введения дозы. Влияние конъюгата 1 на общее количество CD8 клеток может быть определено при 0,003 мг/кг. В подтверждение этих результатов конъюгат 1 индуцирует значительный % положительности в отношении Ki-67 в CD8 Т-клетках, обнаруживаемый при низкой дозе 0,01 мг/кг. Активация конъюгатом 1 пути передачи сигнала JAK/STAT также

является устойчивой в CD8 Т-клетках с зависимым от дозы увеличением pSTAT5 при уровнях доз 0,1 и 0,01 мг/кг.

Фиг. 44В, 45В и 46В представляют собой графики количеств CD8 Т-клеток, % Ki-67 и % pSTAT5 соответственно в течение времени после обработки конъюгатом 1.

Конъюгат 1 оказывает относительно небольшое влияние на суммарное количество CD4 Т-клеток (определяемых как CD45+ CD3+ CD4+ CD8-) у NHP по сравнению с NK и CD8 Т-клетками. Конъюгат 1, введенный при максимальном уровне дозы 0,1 мг/кг, индуцировал небольшое увеличение количеств CD4 Т-клеток, % Ki-67 и % pSTAT5.

Фиг. 44С, 45С и 46С представляют собой графики количеств CD4 Т-клеток, % Ki-67 и pSTAT5 соответственно в течение времени после обработки конъюгатом 1.

NK-клетки являются наиболее чувствительными при ответе на дозу конъюгата 1 по сравнению с CD8 Т-клетками или CD4 Т-клетками *in vivo* у NHP.

У яванского макака субпопуляции CD8 наивных клеток и клеток памяти определяли с помощью CD45Ra, CD197 и CD95. Исследование пролиферации (% Ki-67) CD8 наивных Т-клеток (CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra+CD197+), CD8 T_{scm} (CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra+CD197+CD95+), CD8 T_{cm} (CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra-CD197-) и CD8 T_{em} (CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra-CD197+) выявило повышенную чувствительность субпопуляций CD8 клеток памяти к конъюгату 1 по сравнению с CD8 наивными Т-клетками. В популяциях CD8 T_{em}, T_{cm} и T_{scm} конъюгат 1 индуцировал усиленную экспрессию % Ki-67 зависимым от дозы образом с поддающимся обнаружению увеличением положительности в отношении маркера пролиферации, начиная уже с дня 2, которая достигала максимума в день 5 и возвращалась к исходному уровню в период от дня 10 до дня 14. Экспрессия и кинетика Ki-67 в популяциях CD8 подтверждают устойчивое повышение количеств CD8 Т-клеток, показанное в примере 27 и на фиг. 47А-Д.

Фиг. 47А-Д представляют собой графики % Ki-67 для популяций CD8 T_{native}, T_{scm}, T_{cm} и T_{em} в течение времени после обработки конъюгатом 1. Как видно из фигур, популяции CD8 Т-клеток памяти показывали повышенную чувствительность к однократной дозе конъюгата 1 по сравнению с наивными CD8 Т-клетками *in vivo* у NHP.

Пример 28. Индуцирование гранзима В или перфорина конъюгатом 1

Экспрессию цитолитических ферментов NK, представляющих собой гранзим В и перфорин, исследовали у яванских макаков после однократной дозы конъюгата 1. Уровни экспрессии гранзима В и перфорина количественно определяли по средней интенсивности флуоресценции (MFI) в NK-клетках при уровнях дозы 0,001, 0,01 или 0,1 мг/кг. Конъюгат 1 увеличивал MFI гранзима В примерно в 3 раза (пиковое значение по сравнению со значением до введения дозы) при 0,01 и 0,1 мг/кг. Конъюгат 1 также увеличивал MFI перфорина примерно в 2 раза (пиковое значение по сравнению со значением до введения дозы) при 0,01 и 0,1 мг/кг. В целом, конъюгат 1 не только индуцировал устойчивое размножение NK-клеток, но также мог усиливать их функцию.

Фиг. 48А-С представляют собой графики MFI гранзима В, а фиг. 49А-С представляют собой графики MFI перфорина до введения дозы (исходный уровень) и периода времени, соответствующего достижению пиковых уровней после обработки конъюгатом 1 (0,0001-0,1 мг/кг), у NHP.

Конъюгат 1 повышает белковые уровни цитотоксических ферментов, таких как конститутивно экспрессируемые гранзим В и перфорин, в NK-клетках NHP.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 (rhIL-15)

10 20 30 40 50 60

NWWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCVKVTAM KCFLELQVI SLESGDASIH

70 80 90 100 110

DTVENLILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

SEQ ID NO:2

-1 10 20 30 40 50 60

M NWWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCVKVTAM KCFLELQVI SLESGDASIH

70 80 90 100 110

DTVENLILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

SEQ ID NO:3

10 20 30 40 50 60

MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCF SAGLPKTEANW VNVISDLKKI

70 80 90 100 110 120

EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLELQVISL ESGDASIHDT VENLILANN

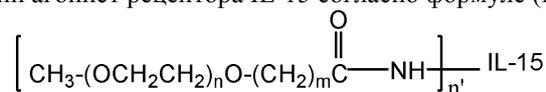
130 140 150 160

SLSSNGNVTE SGCKECEEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения состояния, поддающегося лечению интерлейкином-15 (IL-15), содержащая

длительно действующий агонист рецептора IL-15 согласно формуле (I)



где IL-15 представляет собой фрагмент, представляющий собой интерлейкин-15,

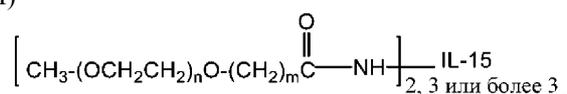
n в формуле (I) представляет собой целое число от 150 до 3000;

m в формуле (I) представляет собой целое число от 2 до 5, и

-NH- в формуле (I) представляет собой аминогруппу фрагмента, представляющего собой IL-15,

n' в формуле (I) равно 1;

где композиция содержит не более 15 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15, охватываемых формулой (II)



где IL-15 представляет собой фрагмент, представляющий собой интерлейкин-15,

n в формуле (II) представляет собой целое число от 150 до 3000;

m в формуле (II) представляет собой целое число от 2 до 5 и

-NH- в формуле (II) представляет собой аминогруппу фрагмента, представляющего собой IL-15; и

где среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов, ковалентно присоединенных к аминогруппам IL-15, для длительно действующих агонистов рецептора формулы (I) и формулы (II), содержащихся в композиции, находится в диапазоне от 1,0 до 1,3.

2. Композиция по п.1, где n как в формуле (I), так и в формуле (II) представляет собой целое число от 200 до 2000, или от 400 до 1300, или от 450 до 1200.

3. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где m как в формуле (I), так и в формуле (II) равняется 2 или 3.

4. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где m как в формуле (I), так и в формуле (II) равняется 3.

5. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где n как в формуле (I), так и в формуле (II) представляет собой целое число, имеющее значение, которое соответствует полиэтиленгликолевому полимеру, характеризующемуся средневесовой молекулярной массой, выбранной из группы, состоящей из 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 40000, 50000 и 60000 Да.

6. Композиция по п.1, содержащая не более 10 мол.% указанных длительно действующих агонистов рецептора IL-15 формулы (II).

7. Композиция по п.1, содержащая не более 7 мол.% длительно действующих агонистов рецептора

IL-15, которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой (II).

8. Композиция по п.1, содержащая не более 5 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15 формулы (II).

9. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где среднее число полиэтиленгликолевых фрагментов, ковалентно присоединенных к аминок группам IL-15, для длительно действующих агонистов рецептора формулы (I) и формулы (II), содержащихся в композиции, выбирают из 1,0, 1,1, 1,2 и 1,3.

10. Композиция по любому из предыдущих пунктов, имеющая значение EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), которое при сравнении со значением EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) немодифицированного IL-15 снижено не более чем в 7 раз.

11. Композиция по любому из предыдущих пунктов, имеющая значение EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), которое при сравнении со значением EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) немодифицированного IL-15 снижено не более чем в 6,5 раз, не более чем в 6 раз, не более чем в 5,5 раза, не более чем в 5 раз, не более чем в 4,5 раза, не более чем в 4 раза, не более чем в 3,5 раза и не более чем в 3 раза.

12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, имеющая значение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), которое снижено не более чем на 50% по сравнению со значением связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) немодифицированного IL-15.

13. Композиция по любому из предыдущих пунктов, имеющая значение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), которое снижено не более чем на 45%, не более чем на 40%, не более чем на 35% или не более чем на 30% по сравнению со значением связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) немодифицированного IL-15.

14. Композиция по любому из предыдущих пунктов, имеющая значение EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2), которое снижено не более чем в 7 раз по сравнению со значением EC50 (нг/мл, pSTAT5 в CTLL-2) немодифицированного IL-15, и имеющая значение связывания альфа-рецептора (K_D , пМ), которое снижено не более чем на 50% по сравнению со значением связывания альфа-рецептора (K_D , пМ) немодифицированного IL-15.

15. Композиция по любому из пп.1-14, в которой указанные длительно действующие агонисты рецептора IL-15, содержащиеся в композиции, деамидированы менее чем на 35%.

16. Композиция по любому из пп.1-15, содержащая смесь позиционных изомеров длительно действующих агонистов рецептора IL-15 в соответствии с формулой (I).

17. Композиция по п.16, в которой для смеси позиционных изомеров формулы (I) аминок группа находится преимущественно на N-конце фрагмента IL-15.

18. Композиция по любому из пп.1-17, где n в формуле (I) и формуле (II) составляет около 909.

19. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где IL-15 имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-3.

20. Способ стимуляции активации и пролиферации NK-клеток у субъекта-млекопитающего, включающий введение терапевтически эффективной дозы композиции по любому из пп.1-19.

21. Способ поддержания выживания CD8 T-клеток и формирования ими памяти, включающий введение субъекту терапевтически эффективной дозы композиции по любому из пп.1-19.

22. Способ лечения состояния, которое отвечает на лечение с помощью IL-15, путем введения субъекту, у которого имеется состояние, терапевтически эффективной дозы композиции по любому из пп.1-19.

23. Способ лечения рака путем введения субъекту, у которого имеется рак, терапевтически эффективной дозы композиции по любому из пп.1-19.

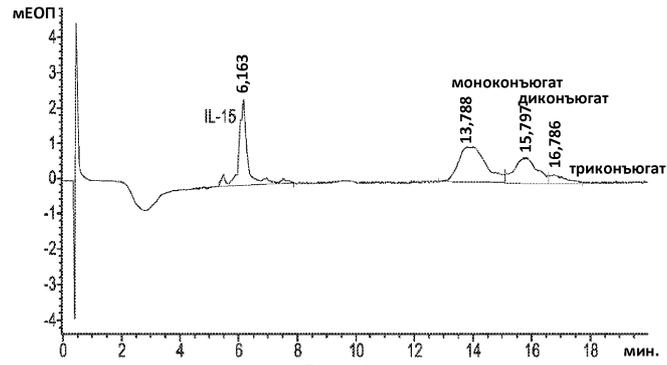
```

SEQ ID NO:1
  10      20      30      40      50      60
MNVVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLEELQV ISLESGDAST
  70      80      90     100     110
EDTVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS

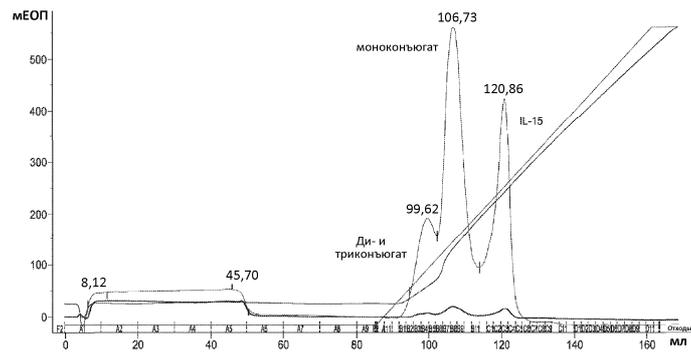
```

Фиг. 1

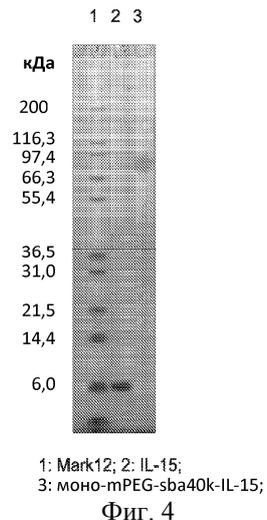
043667



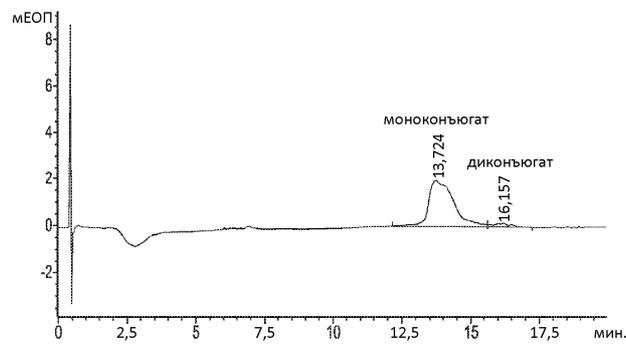
Фиг. 2



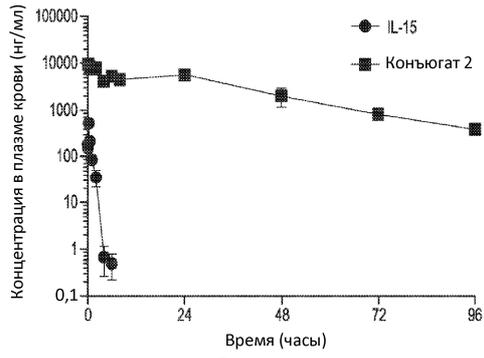
Фиг. 3



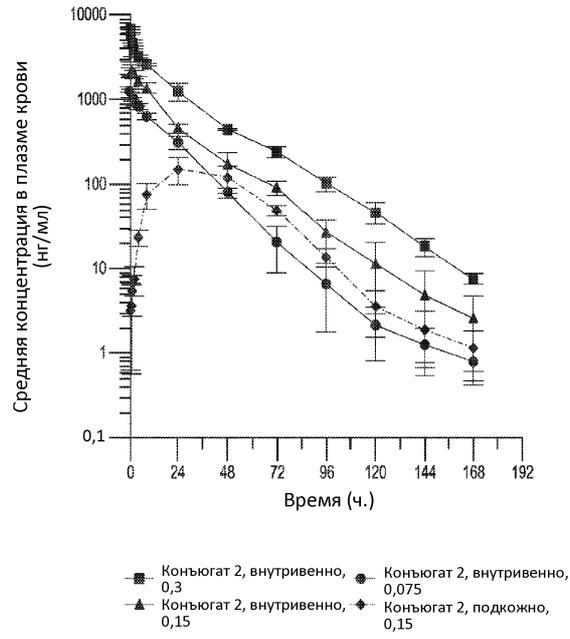
Фиг. 4



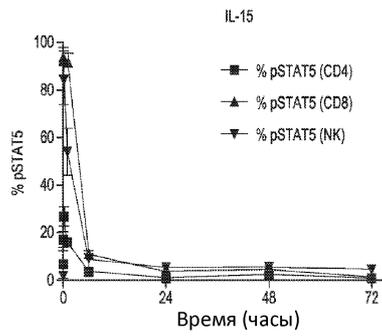
Фиг. 5



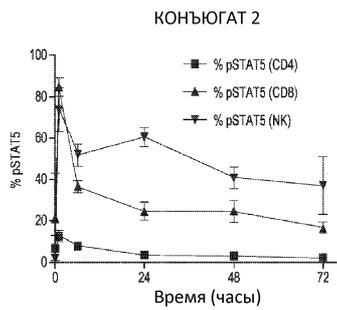
Фиг. 6



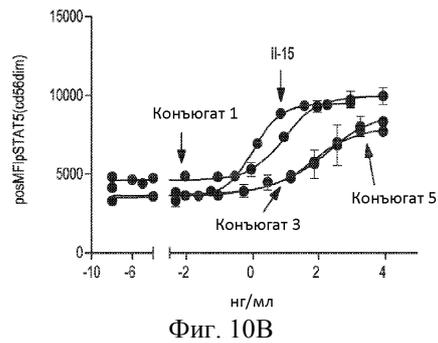
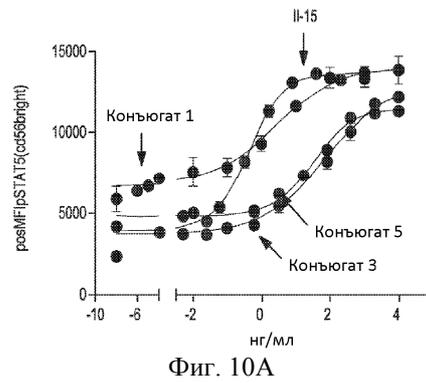
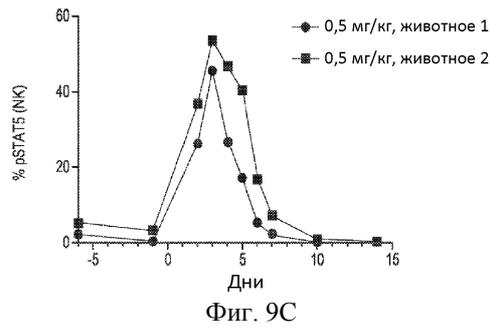
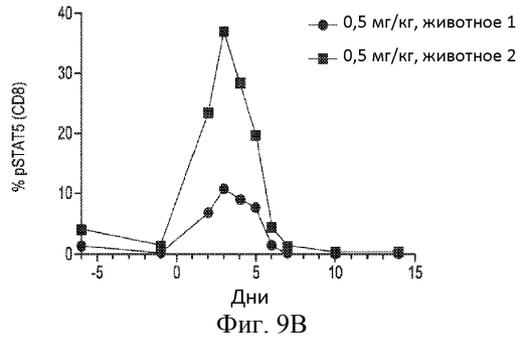
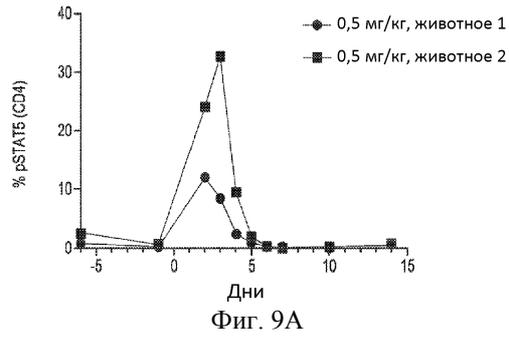
Фиг. 7



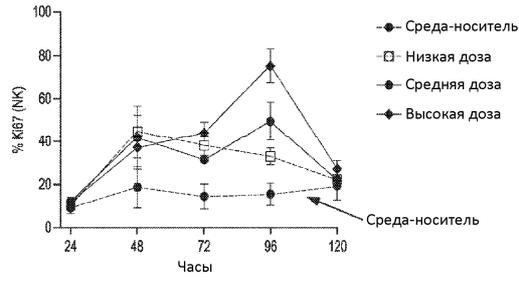
Фиг. 8А



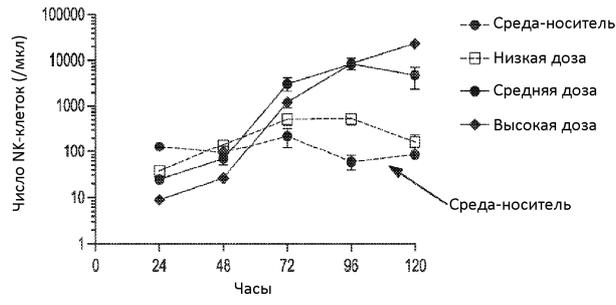
Фиг. 8В



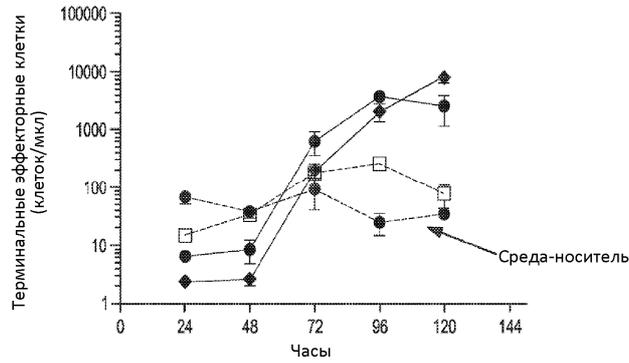
043667



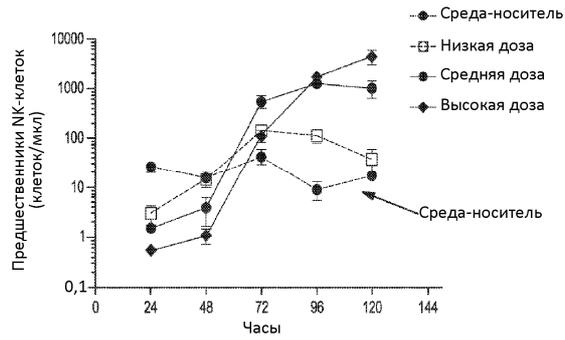
Фиг. 11А



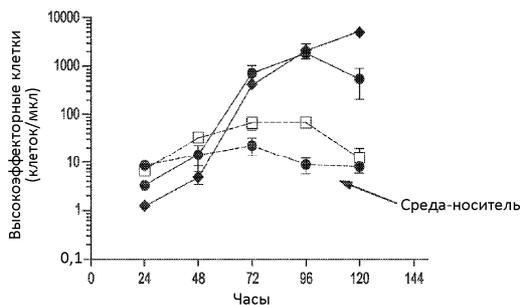
Фиг. 11В



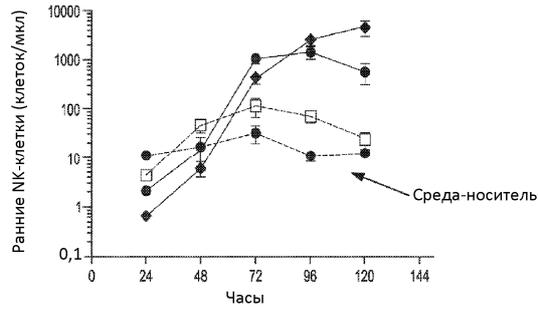
Фиг. 12А



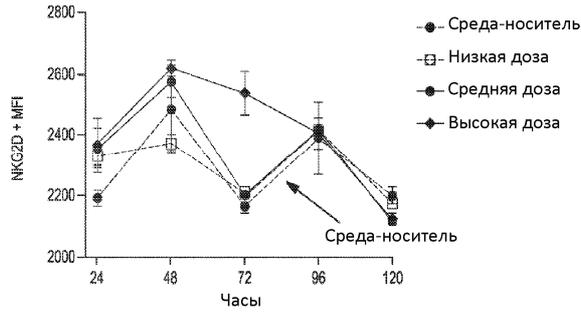
Фиг. 12В



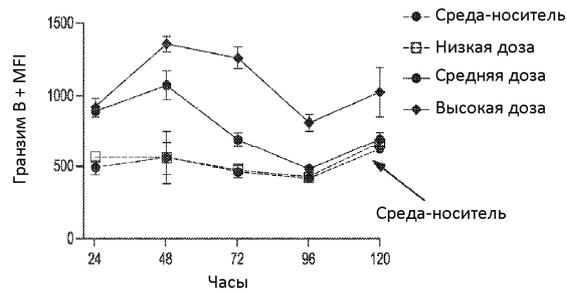
Фиг. 12С



Фиг. 12D



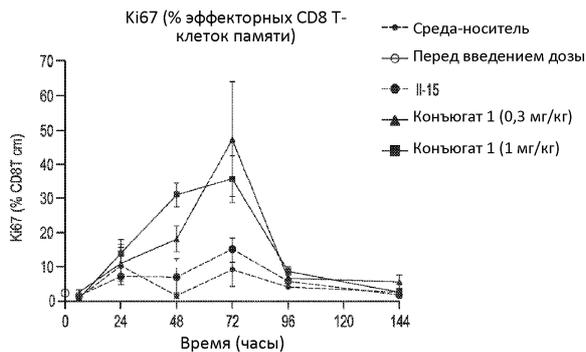
Фиг. 13А



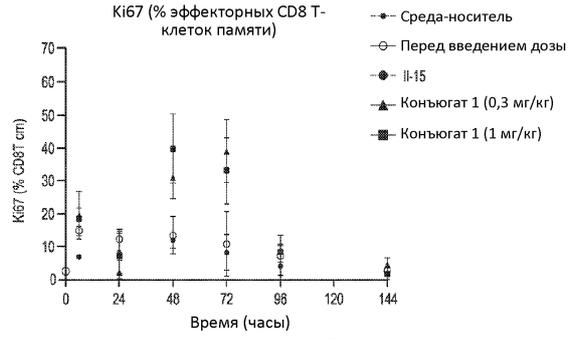
Фиг. 13В



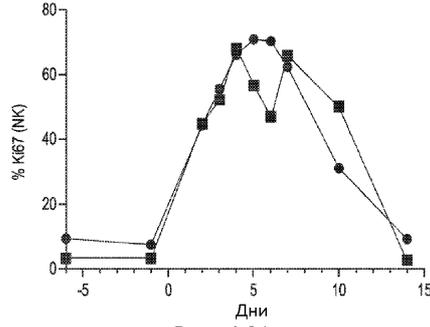
Фиг. 14



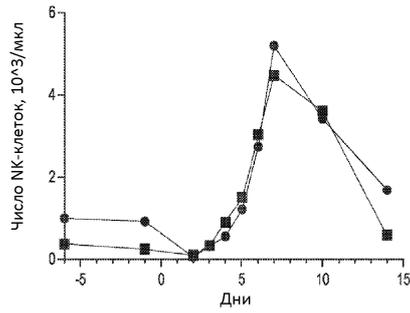
Фиг. 15А



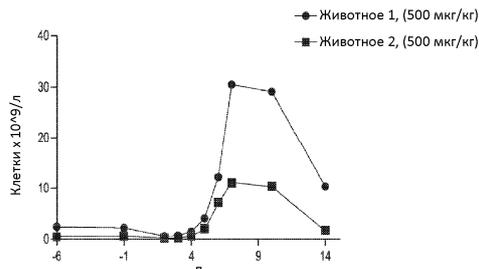
Фиг. 15В



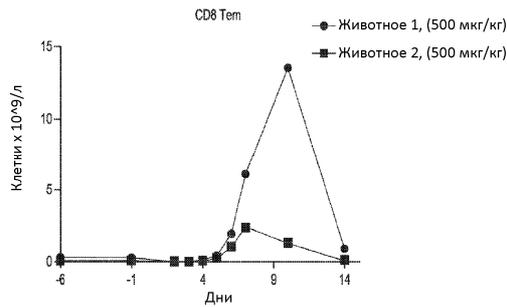
Фиг. 16А



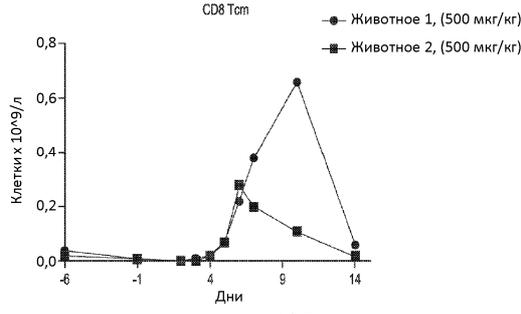
Фиг. 16В



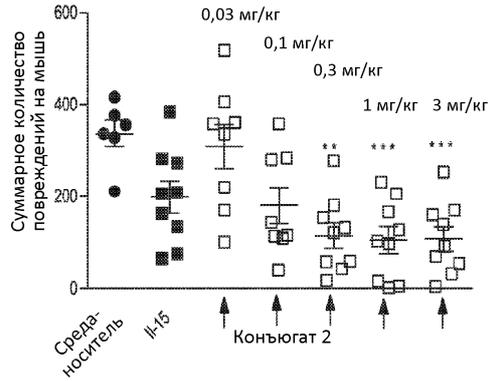
Фиг. 17



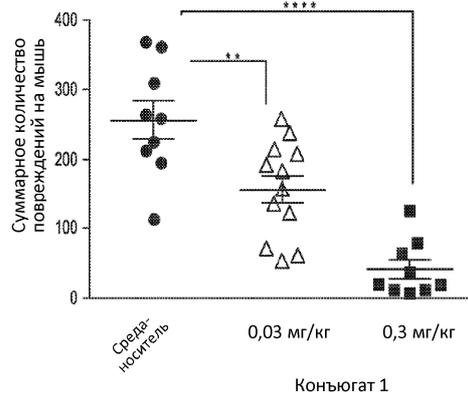
Фиг. 18А



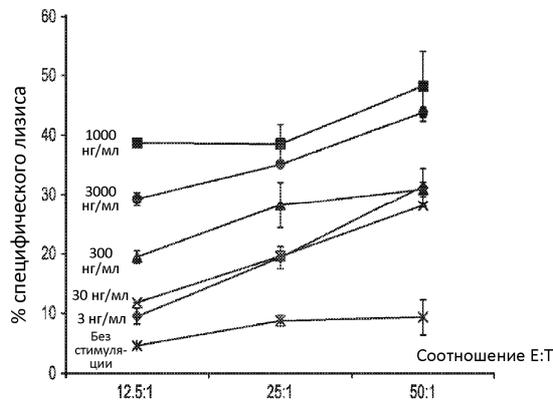
Фиг. 18В



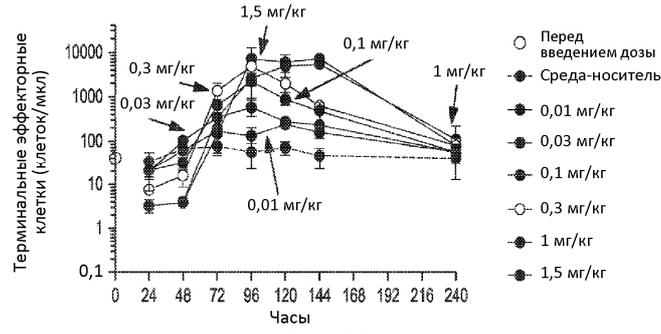
Фиг. 19



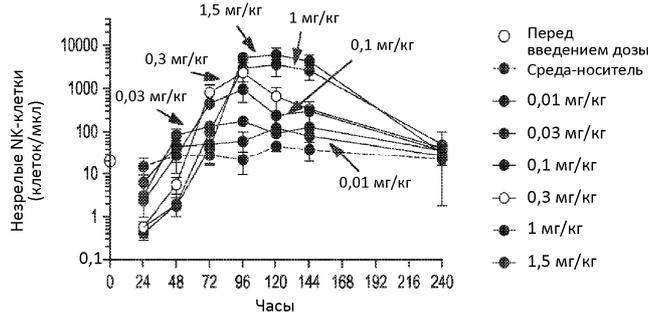
Фиг. 20



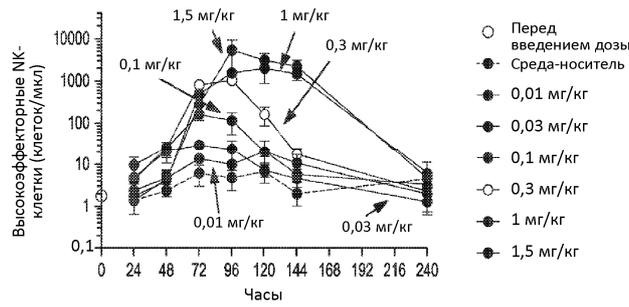
Фиг. 21



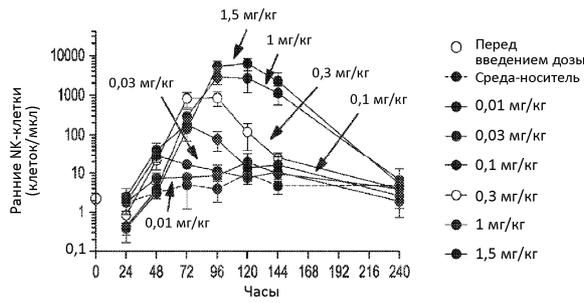
Фиг. 22А



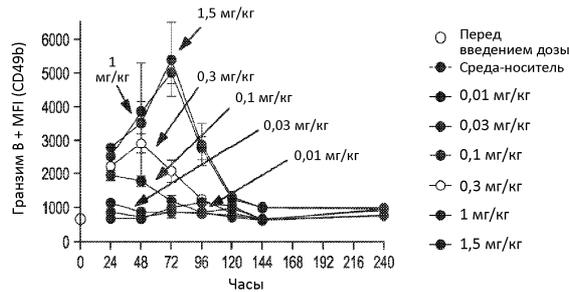
Фиг. 22В



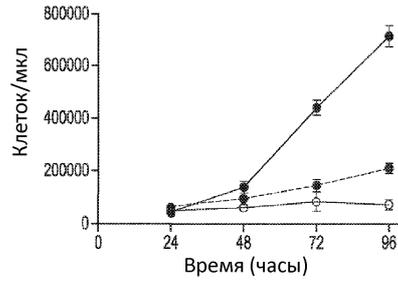
Фиг. 22С



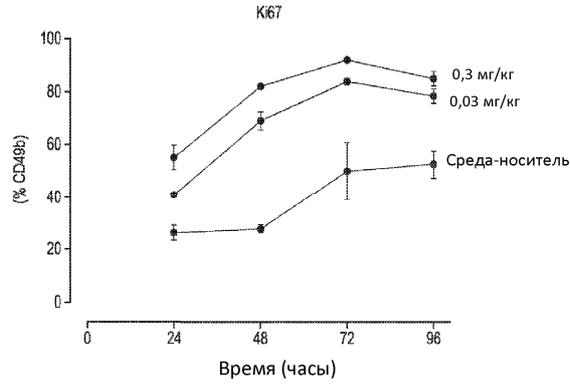
Фиг. 22D



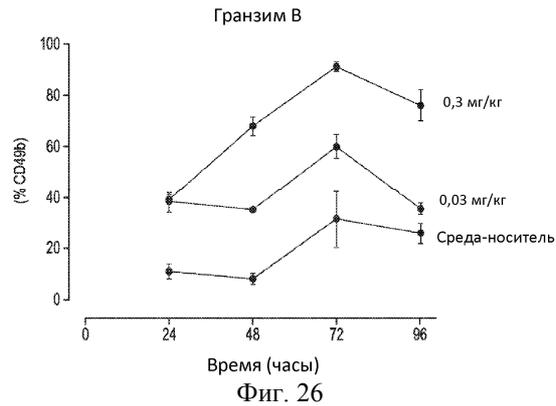
Фиг. 23



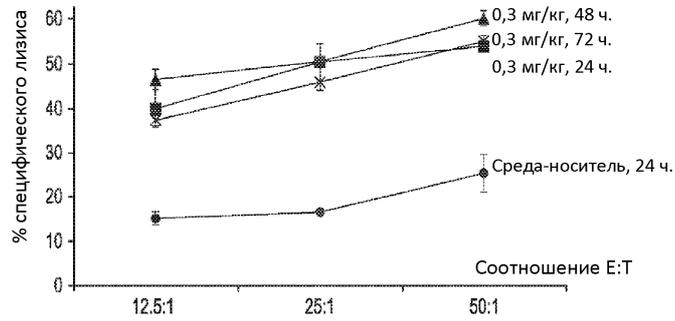
Фиг. 24



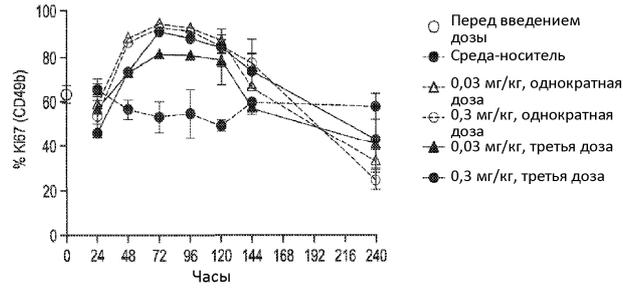
Фиг. 25



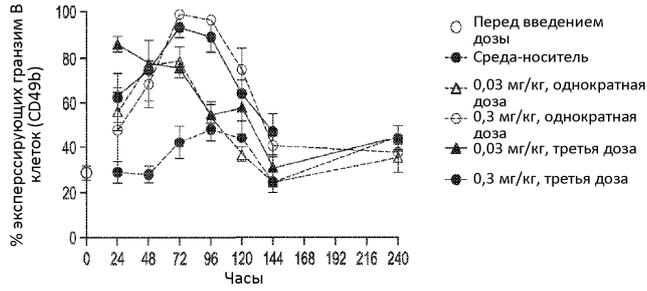
Фиг. 26



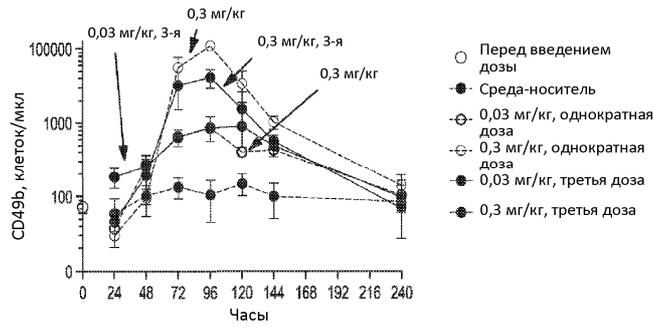
Фиг. 27



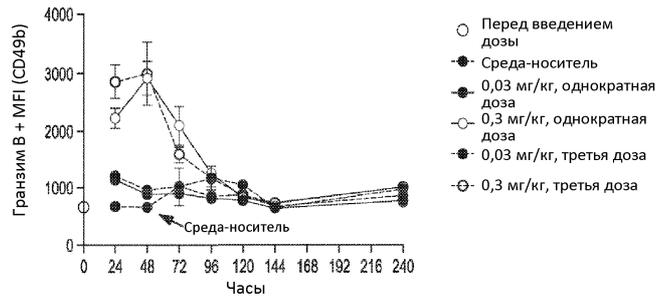
Фиг. 28А



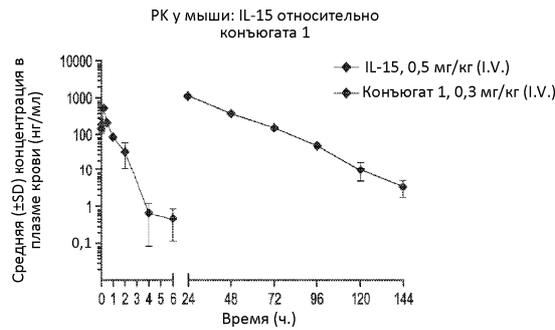
Фиг. 28В



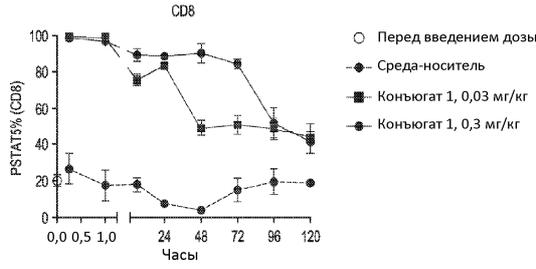
Фиг. 28С



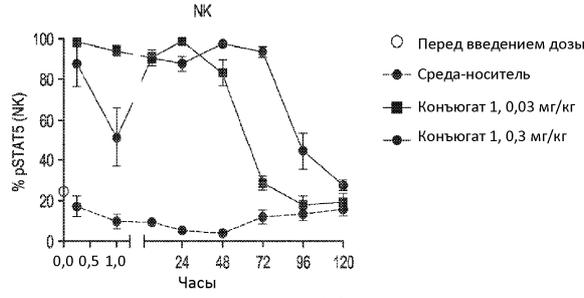
Фиг. 28D



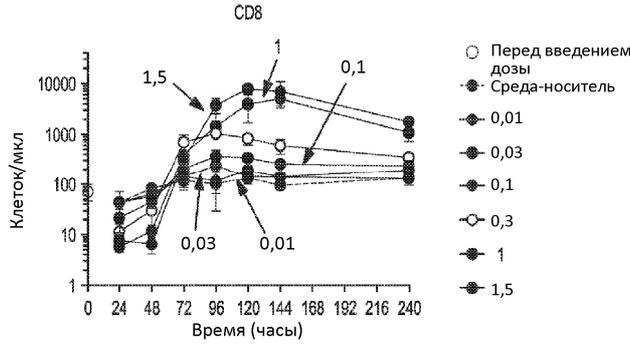
Фиг. 29А



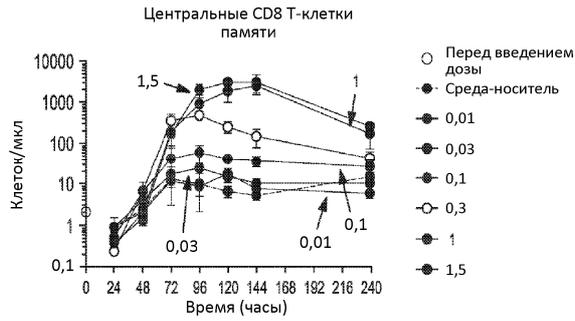
Фиг. 29В



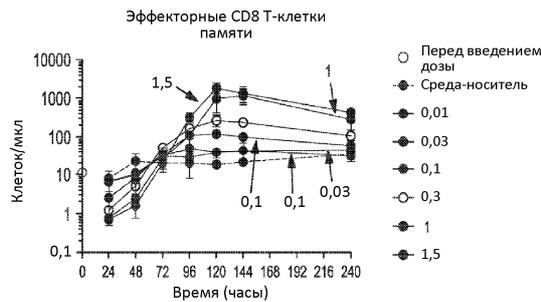
Фиг. 29С



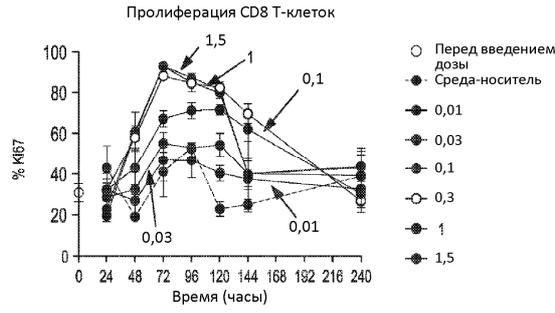
Фиг. 30А



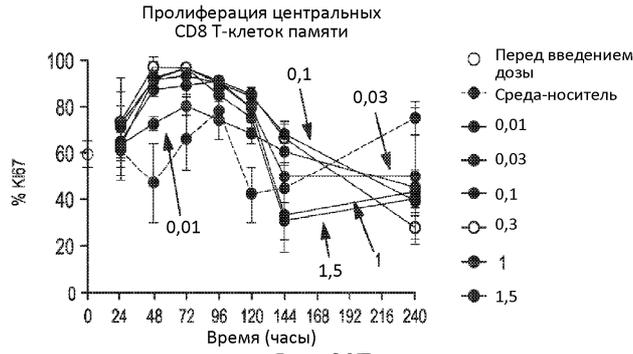
Фиг. 30В



Фиг. 30С



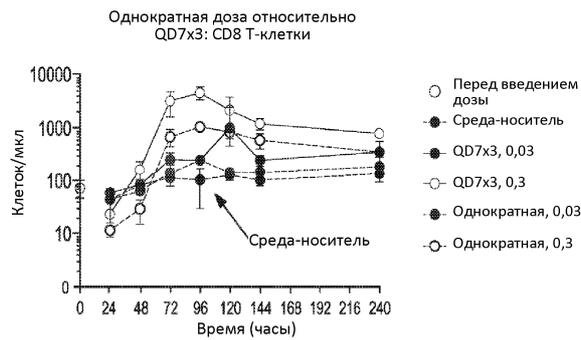
Фиг. 30D



Фиг. 30E

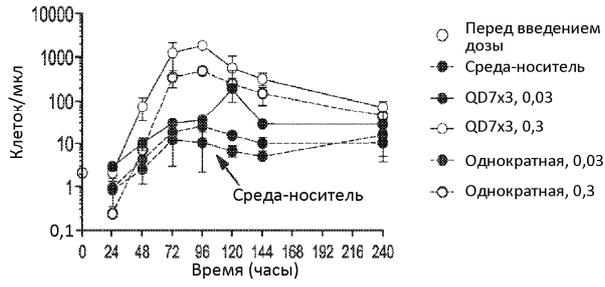


Фиг. 30F



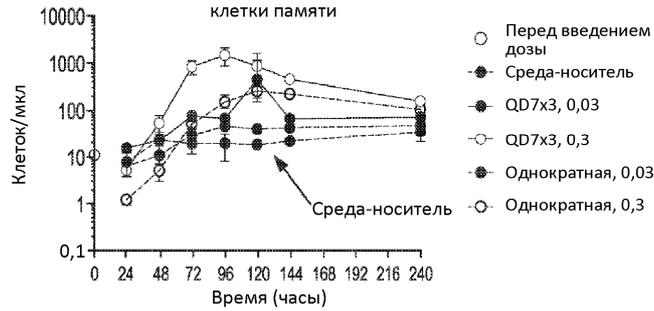
Фиг. 31A

Однократная доза относительно QD7х3: центральные CD8 T-клетки памяти



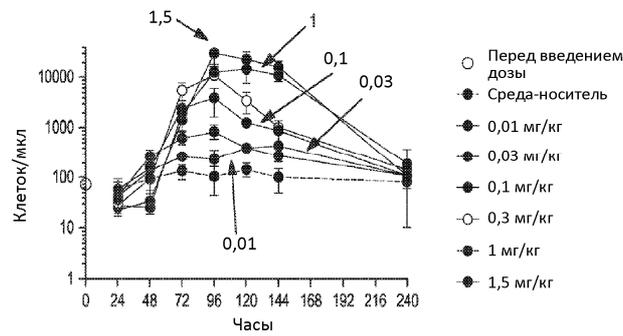
Фиг. 31В

Однократная доза относительно QD7х3: эффекторные CD8 T-клетки памяти



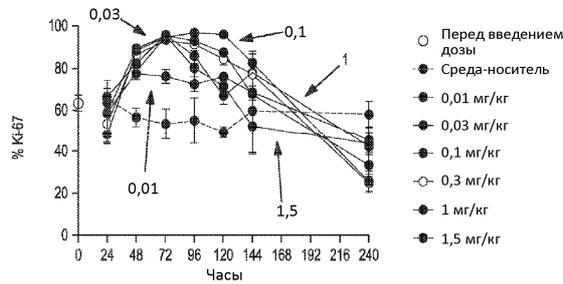
Фиг. 31С

NK-клетки

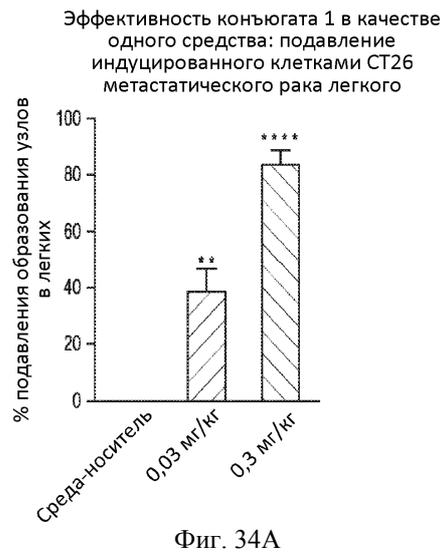
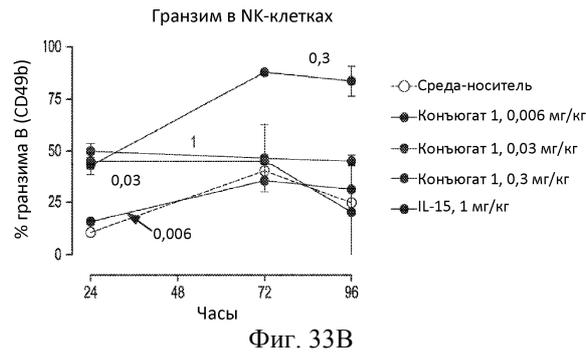
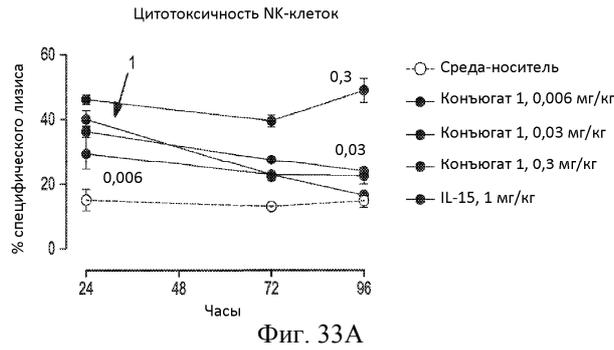
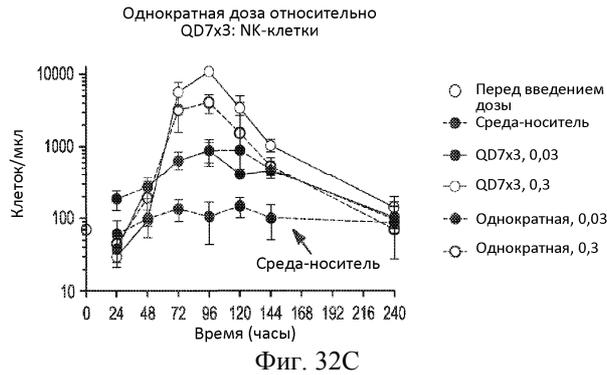


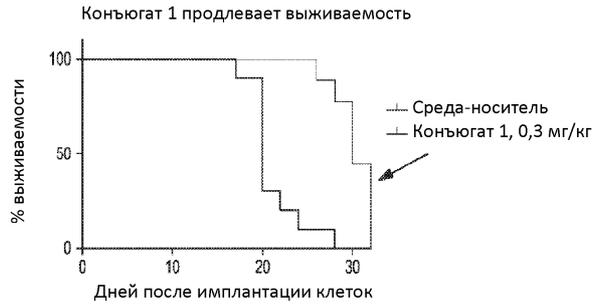
Фиг. 32А

Пролиферация NK-клеток

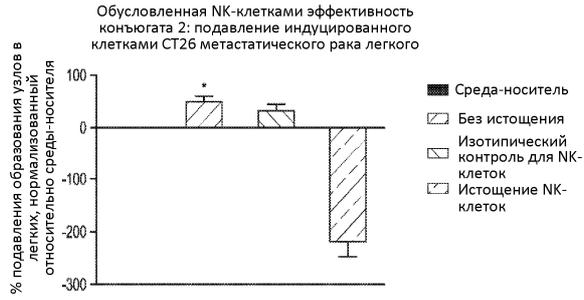


Фиг. 32В

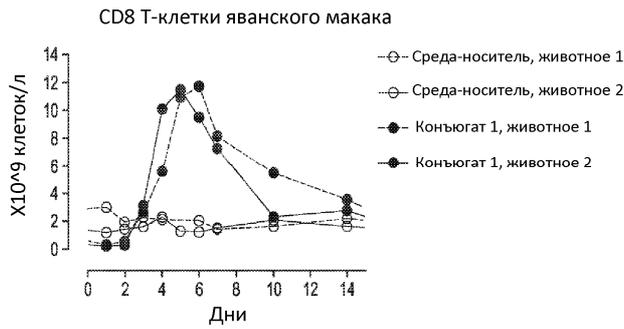




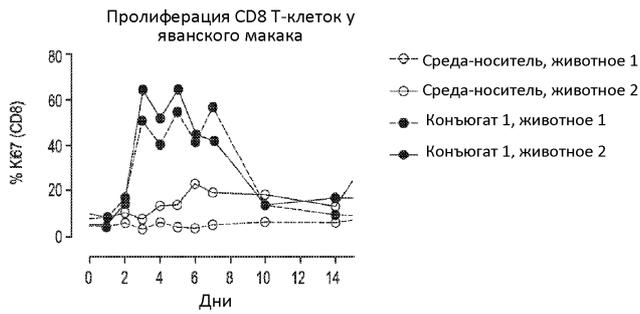
Фиг. 34В



Фиг. 35



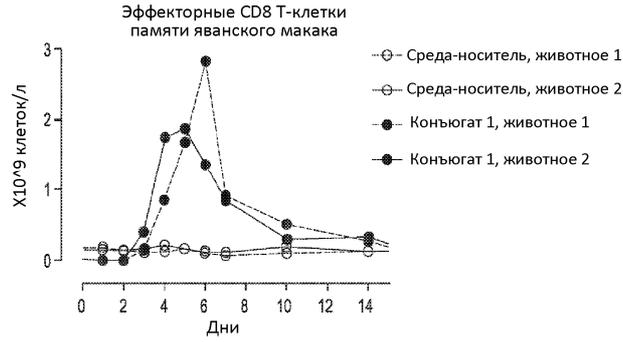
Фиг. 36А



Фиг. 36В



Фиг. 36С



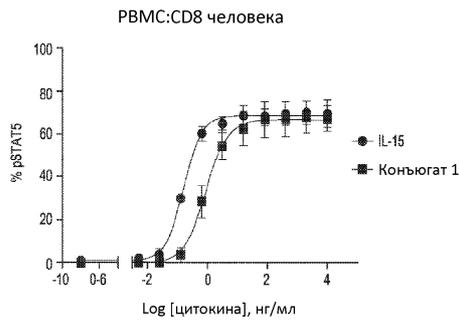
Фиг. 36D



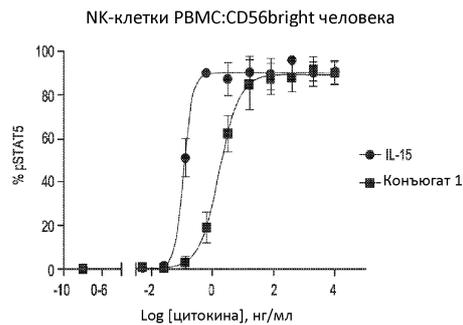
Фиг. 37A



Фиг. 37B

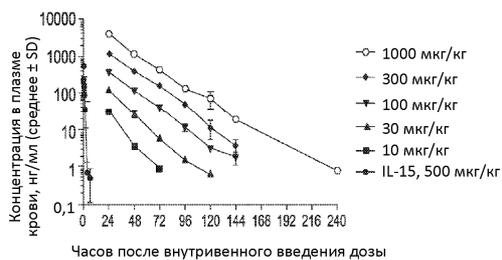


Фиг. 38A



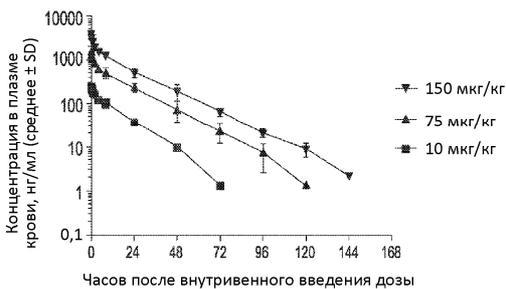
Фиг. 38B

PK IL-15 и конъюгата 1 у мышей



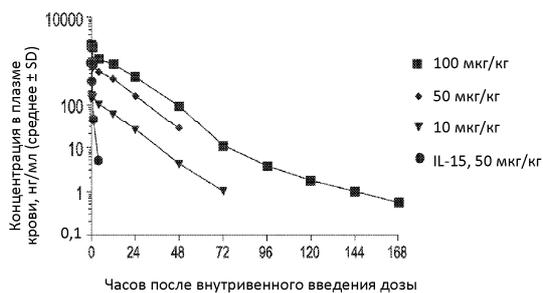
Фиг. 39

PK конъюгата 1 у крыс



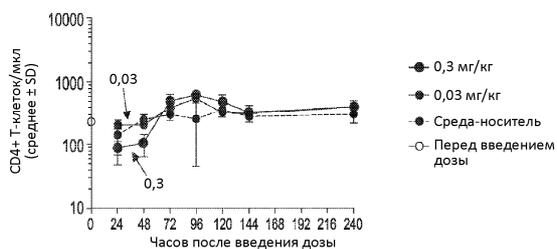
Фиг. 40

PK IL-15 и конъюгата 1 у NHP



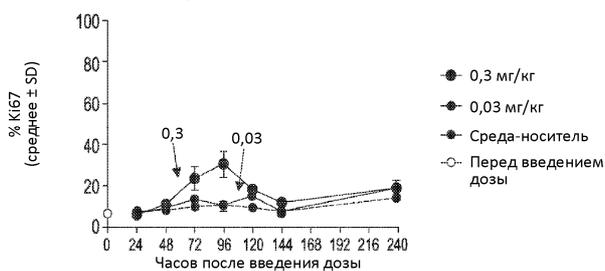
Фиг. 41

Число CD4 T-клеток в крови



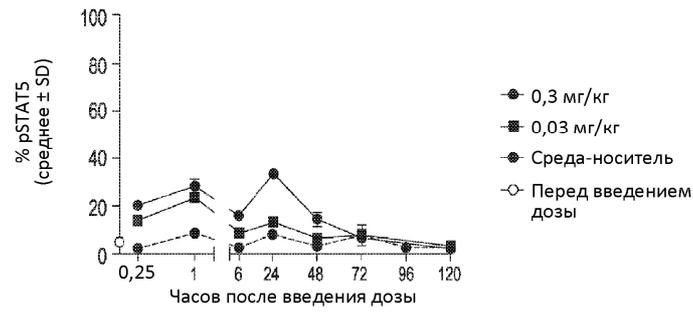
Фиг. 42А

% Ki67+ CD4 T-клеток

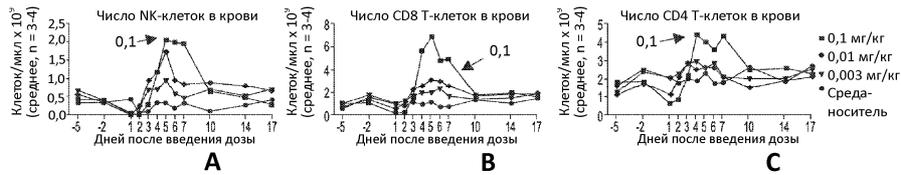


Фиг. 42В

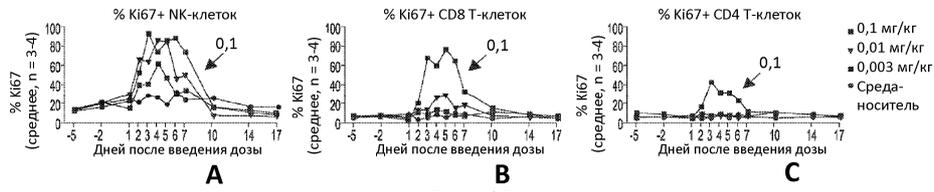
% pSTAT5+ CD4 T-клеток



Фиг. 43



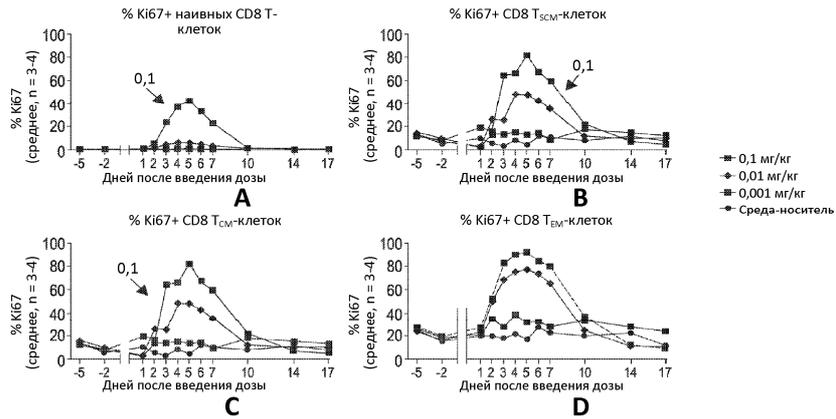
Фиг. 44



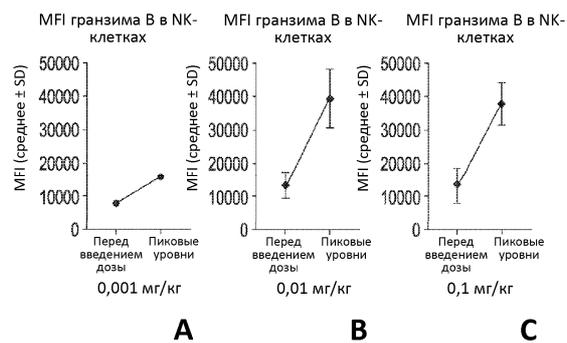
Фиг. 45



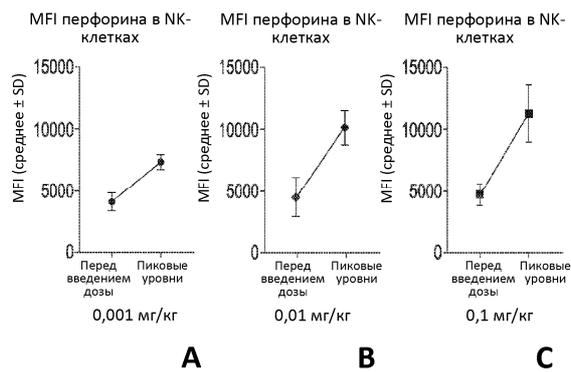
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

