

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046466**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.18

(21) Номер заявки
202191312

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

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

(54) **ДЛИТЕЛЬНО ДЕЙСТВУЮЩИЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-15 В КОМБИНАЦИИ С ДРУГИМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМ СРЕДСТВОМ**

(31) **62/758,344; 62/789,924; 62/818,003;
62/825,437; 62/843,036; 62/848,372;
62/924,015**

(32) **2018.11.09; 2019.01.08; 2019.03.13;
2019.03.28; 2019.05.03; 2019.05.15;
2019.10.21**

(33) **US**

(43) **2021.07.27**

(86) **PCT/US2019/060609**

(87) **WO 2020/097556 2020.05.14**

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

(72) Изобретатель:
**Миядзаки Такахиро, Мадакамутил
Луи, Кивимае Сол (US)**

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

(56) **US-A1-20150374790
US-A1-20170035898
WO-A1-2018213341
US-A1-20170246253
US-A1-20170088631
US-A1-20150132257**

(57) В изобретении представлено комбинированное лечение, композиция и набор, содержащий: (a) длительно действующий агонист рецептора IL-15 и (b) одно или несколько антител (mAb), нацеленных на опухолевый антиген, связанные с ними способы получения и применения, например, в лечении состояний, отвечающих на терапию, эффективную в отношении обеспечения, например, устойчивой иммунной активации и/или противоопухолевой активности.

B1

046466

046466

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка испрашивает преимущество в соответствии с 35 U.S.C. §119(e) по предварительным заявкам на патент США с серийными номерами: 62/758344, поданной 9 ноября 2018 г.; 62/789924, поданной 8 января 2019 г.; 62/818003, поданной 13 марта 2019 г.; 62/825437 поданной 28 марта 2019 г.; 62/843036, поданной 3 мая 2019 г.; 62/848372, поданной 15 мая 2019 г. и 62/924015, поданной 21 октября 2019 г., каждая из которых включена в данный документ с помощью ссылки.

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится (среди прочего) к терапевтическим комбинациям и композициям, содержащим длительно действующий агонист рецептора интерлейкина-15 ("IL-15") и другое фармакологически активное средство, т.е. антитело, такое как моноклональное антитело, и связанным способам 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). Секретированный 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. Принадлежит 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, и при этом β - и γ -субъединицы этого 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 выживаемости 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, обеспечивая тем самым 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 характеризуется значительными и обширными эффектами 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. Было также показано, что опосредованные IL-15 ответы играют роль в развитии, функционировании и выживаемости CD8+ Т-клеток и интраэпителиальных лимфоцитов кишечника.

Поскольку он стимулирует пролиферацию и поддержание многих клеток иммунной системы, которые могут бороться с клетками, представляющимися 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.

Был описан длительно действующий агонист рецептора IL-15, содержащий по меньшей мере один водорастворимый полимерный (например, полиэтиленгликоль) фрагмент, стабильно ковалентно связанный с аминокислотной группой IL-15 (заявка РСТ № РСТ/US 2018/032817, включенная в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме) как обеспечивающий улучшенные характеристики и профили *in vivo*, такие как, например, мощные иммуностимулирующие эффекты, низкая системная токсичность, стабильность и/или улучшенная фармакокинетика, улучшенные терапевтические эффекты, среди других улучшений, по сравнению с IL-15 и другими агонистами рецептора IL-15.

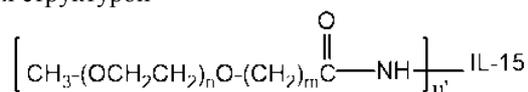
Было установлено создание и использование моноклональных антител (mAb) для лечения некото-

рых форм рака, включая как гематологические злокачественные новообразования, так и солидные опухоли (Scott et al., 2012, Cancer Immunity, vol. 12, p. 14). Механизм действия mAb, связанных с опухолью, включает одно или несколько из следующего: непосредственное воздействие на опухолевые клетки, иммуноопосредованное воздействие и абляция сосудов и стромы. Связанные с опухолью антигены, на которые нацелены mAb, включают антигены кластеров дифференцировки (CD) (например, CD20, CD30, CD33, CD52), гликопротеины (например, EpCAM, CEA, gpA33, муцины и т.д.), гликолипиды (например, ганглиозиды, такие как GD2, GD3 и GM2), сосудистые мишени (например, VEGF, VEGFR), факторы роста (например, ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3, c-MET, IGF1R), а также антигены стромального и внеклеточного матрикса (например, FAP, тенасцин). Для использования в онкологии FDA США был одобрен ряд mAb (например, ритуксимаб, офатумумаб, ZEVALIN®, BEXXAR®, гемтузумаб озогомицин, брентуксимаб ведотин, цетуксимаб и панитумумаб), хотя некоторые типы раковых клеток более уязвимы, чем другие, к терапии на основе моноклональных антител.

Однако, несмотря на вышеизложенные подходы, остается потребность в улучшенных противоопухолевых иммунотерапевтических средствах. Настоящее изобретение направлено на эти и другие потребности путем обеспечения, в частности, комбинированной терапии, включающей длительно действующий агонист рецептора IL-15 и по меньшей мере одно mAb, направленное против опухолевого антигена (комбинация, имеющая ряд преимуществ, которые более подробно будут описаны ниже), а также композиции и наборы, содержащие такие комбинации, а также связанные способы получения и применения, которые считаются новыми и полностью не раскрытыми в уровне техники.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте данного документе представлен способ лечения субъекта, у которого имеется рак. В частности, способ предусматривает введение субъекту длительно действующего агониста рецептора IL-15 и (b) моноклонального антитела, например, моноклонального антитела, которое нацелено на опухолевые клетки, т.е. связывается с ними, где стадии (a) и (b) осуществляют одновременно или последовательно и в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется структурой



формула (I)

где структура также может быть изображена как $[\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}]_{n'}\text{-IL-15}$,

где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, (n) представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000, (m) представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, (n') равняется 1, и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; или представляет собой его фармацевтически приемлемую солевую форму. В некоторых конкретных вариантах осуществления (m) в формуле (I) равняется 2 или 3. В предпочтительном варианте осуществления (m) в формуле (I) равняется 3. В некоторых конкретных вариантах осуществления (n) в формуле (I) имеет среднее значение приблизительно 227, или среднее значение приблизительно 340, или среднее значение приблизительно 454, или среднее значение приблизительно 681, или среднее значение приблизительно 909. В одном или нескольких вариантах осуществления (n) имеет значение приблизительно 909.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с опухолевым антигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста.

В дополнительных вариантах осуществления способа у субъекта имеется солидный рак. В некоторых вариантах осуществления солидный рак выбран из группы, состоящей из рака груди, рака яичника, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, злокачественной меланомы, множественной миеломы, рака печени, лимфомы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, форм рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного протока, рака головного мозга, рака шейки матки, рака гайморовой пазухи, рака мочевого пузыря, рака пищевода, болезни Ходжкина и рака надпочечников, включая метастатические формы любого из вышеперечисленных.

В некоторых других вариантах осуществления у субъекта имеется лимфома или лейкемия.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления у субъекта имеется множественная миелома.

В некоторых вариантах осуществления способа стадию (a) осуществляют перед стадией (b). В других вариантах осуществления стадию (b) осуществляют перед стадией (a). В еще дополнительных вариантах осуществления стадию (a) и стадию (b) осуществляют одновременно или по сути одновременно. Способ может дополнительно предусматривать один или несколько дополнительных циклов дозирования одного или обоих из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления введение является эффективным для стимуляции активации и пролиферации NK в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда длительно дейст-

вующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели. В некоторых дополнительных вариантах осуществления введение является эффективным в отношении поддержания выживаемости CD8 Т-клеток и формирования памяти в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели. В некоторых дополнительных вариантах осуществления введение является эффективным в отношении уменьшения количества опухолевых клеток в большей степени, чем наблюдаемое при введении длительно действующего агониста рецептора как единственного средства (т.е. в виде монотерапии), и в большей степени, чем наблюдаемое при введении моноклонального антитела как единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели (примеры которых представлены в данном документе). В некоторых связанных вариантах осуществления введение приводит к 3-кратному или большему сокращению, или более предпочтительно 5-кратному или большему сокращению, или более предпочтительно 7-кратному или большему сокращению количества опухолевых клеток у субъекта по сравнению с введением эквивалентной дозы длительно действующего агониста рецепторов как единственного средства. В некоторых дополнительных вариантах осуществления введение является эффективным для индукции пролиферации NK-клеток (т.е. для увеличения количества NK-клеток) и для активации их способности уничтожать опухолевые клетки, например, в ткани костного мозга.

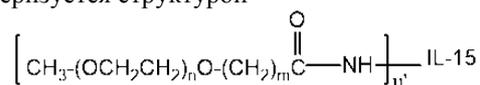
В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят подкожно. В дополнительных вариантах осуществления моноклональное антитело вводят внутривенно.

В одном или нескольких вариантах осуществления антитело представляет собой целевое моноклональное антитело, которое использует механизм действия антителозависимой клеточной токсичности (ADCC, также называемой антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью).

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело выбрано из антитела к CD19, антитела к CD20 и антитела к CD38. В дополнительных вариантах осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывается с гликопротеином, выбрано из антитела к SLAMF7, антитела к EpCAM, антитела к gpA3 3 и антитела к FBP. В дополнительных вариантах осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывается с фактором роста, выбрано из антитела к VEGF, антитела к VEGFR и антитела к EGFR. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к BCMA. В некоторых дополнительных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, нацеленное на множественную миелому.

Во втором аспекте в данном документе представлена терапевтическая комбинация для применения в лечении состояния, такого как рак. Комбинация содержит длительно действующий агонист рецептора IL-15 и моноклональное антитело, например, моноклональное антитело, которое нацелено, т.е. связывается с опухолевыми клетками, включая без ограничения моноклональные антитела, описанные в данном документе.

В некоторых связанных и более конкретных вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется структурой



формула (I)

где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, (n) представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000, (m) представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, (n') равняется 1, и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; или его фармацевтически приемлемую солевую форму. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с опухолевым антигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста. В некоторых вариантах осуществления (m) в формуле (I) равняется 2 или 3. В некоторых конкретных вариантах осуществления (m) в формуле (I) равняется 3. В некоторых дополнительных вариантах осуществления (n) в формуле (I) имеет значение приблизительно 227, или приблизительно 340, или приблизительно 454, или приблизительно 681, или приблизительно 909. В одном или нескольких вариантах осуществления (n) имеет значение приблизительно 909.

В третьем аспекте в данном документе представлен набор. В вариантах осуществления набор содержит терапевтическую комбинацию длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела, как описано в данном документе, с прилагаемыми инструкциями по применению, где каждый из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела содержится в одной или нескольких отдельных единичных лекарственных формах. Набор и терапевтическая комбинация применимы, например, для лечения пациента, страдающего от рака.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изложены в нижеследующих описании и формуле изобретения. Предполагается, что варианты осуществления, описанные в данном документе, в равной степени применяются к каждому из аспектов, описанных в данном документе, и должны рассматриваться как по отдельности, так и в комбинации, как это применимо, если не указано иное.

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.

На фиг. 2 представлен график, иллюстрирующий процент выживаемости мышей, инокулированных клетками В-клеточной лимфомы Дауди и получавших следующее: (i) изотипический контроль, (ii) ритуксимаб при 40 мг/кг, (iii) длительно действующий агонист рецептора IL-15 при 0,3 мг/кг или (iv) комбинация ритуксимаба при 40 мг/кг и длительно действующего агониста рецептора IL-15 при 0,3 мг/кг, как подробно описано в примере 1.

На фиг. 3 представлен график, иллюстрирующий подсчитанные числа НК-клеток в ткани костного мозга после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы длительно действующего агониста рецептора IL-15, т.е. моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,3 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой, как описано в примере 2.

На фиг. 4 представлен график, иллюстрирующий количества В-клеток Дауди в ткани костного мозга после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,3 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой, как описано в примере 2.

На фиг. 5 представлен график, иллюстрирующий процент выживаемости мышей, инокулированных клетками В-клеточной лимфомы Дауди с последующей обработкой с помощью следующего: (i) изотипический контроль, (ii) даратумумаб при 0,5 мг/кг IP, (iii) длительно действующий агонист рецептора IL-15, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 при 0,3 мг/кг SC или (iv) комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 при 0,3 мг/кг и даратумумаба при 0,5 мг/кг, SC, как подробно описано в примере 3.

На фиг. 6 представлен график, иллюстрирующий индукцию гранзима В в НК-клетках костного мозга после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,3 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой, как подробно описано в примере 2.

На фиг. 7А и 7В представлен график, иллюстрирующий фракцию НК-клеток в компартменте костного мозга, экспрессирующих NKG2A (фиг. 7А) или NKG2D (фиг. 7В), на поверхности клеток после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы конъюгата 1 (0,3 мг/кг или 0,03 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб как единственное средство (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой или (v) группой изотипического контроля (0,5 мг/кг), как подробно описано в примере 4.

На фиг. 8А-8D представлены гистограммы, иллюстрирующие % пролиферации НК-клеток человека в препарате мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) при обработке с помощью (i) соединения 1 отдельно (фиг. 8С), (ii) hIgG отдельно (фиг. 8В), (iii) соединения 1+hIgG (фиг. 8D) или (iv) необработанного контроля (фиг. 8А), как подробно описано в примере 5.

На фиг. 9А представлен график, иллюстрирующий сигнал средней интенсивности флуоресценции (MFI) для CD69-выявляемых антител на поверхности CD56+ НК-клеток в препарате PBMC, культивированном в течение ночи с (i) планшетом, покрытым hIgG, (ii) соединением 1 (1 мкг/мл), (iii) планшетом, покрытым hIgG+соединение 1 (1 мкг/мл), или (ii) контролем, показывающим активацию НК-клеток, как подробно описано в примере 6.

На фиг. 9В представлен график, иллюстрирующий сигнал средней интенсивности флуоресценции (MFI) для CD107a-выявляемых антител на поверхности CD56+ НК-клеток в препарате PBMC, культивированном в течение ночи с (i) планшетом, покрытым hIgG, (ii) соединением 1 (1 мкг/мл), (iii) планшетом, покрытым hIgG+соединение 1 (1 мкг/мл), или (ii) контролем, показывающим активацию НК-клеток, как подробно описано в примере 6.

На фиг. 9С представлен график, иллюстрирующий индукцию гранзима В в PBMC человека после воздействия следующего: (i) планшет, покрытый hIgG, (ii) соединение 1 (1 мкг/мл), планшет, покрытый hIgG+соединение 1 (1 мкг/мл), или (ii) контроль, как подробно описано в примере 6. На графике показана

концентрация секретированного гранзима В в пг/мл для каждой из четырех обработок.

На фиг. 10А представлен график, иллюстрирующий процент положительности pSTAT5 в клетках КНУГ-1 после инкубации с IL-15 или длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15), как подробно описано в примере 7. На фиг. 10В представлен график % максимальной пролиферации клеток КНУГ-1 после инкубации с IL-15 или длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15), как подробно описано в примере 7.

На фиг. 11 представлен график, иллюстрирующий % максимальной пролиферации CD56+ NK-клеток человека после инкубации с IL-15 или длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15), как подробно описано в примере 8.

На фиг. 12 представлен график, иллюстрирующий % целевых 7-AAD+ клеток для клеток множественной миеломы человека, предварительно покрытых даратумумабом (+), после стимуляции длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15) (+) или необработанных (-), как подробно описано в примере 9.

На фиг. 13А представлен график, иллюстрирующий фракцию NK-клеток в компартменте костного мозга, экспрессирующих CD16 (фиг. 13А), на клеточной поверхности (% клеток, экспрессирующих CD16 в общем количестве NK-клеток) после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы конъюгата 1 (0,3 мг/кг или 0,03 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб как единственное средство (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой или (v) группой изотипического контроля (0,5 мг/кг), как подробно описано в примере 10.

На фиг. 13В представлен график, иллюстрирующий изменение экспрессии CD16 (увеличение в группах, получавших соединение 1) из расчета на одну клетку для CD16+ NK-клеток костного мозга, как измерено с помощью сигнала средней интенсивности флуоресценции (MFI) после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы конъюгата 1 (0,3 мг/кг или 0,03 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб как единственное средство (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой или (v) группой изотипического контроля (0,5 мг/кг), как подробно описано в примере 10.

На фиг. 14 представлен график, иллюстрирующий экспрессию гранзима В в отдельных NK-клетках костного мозга, измеренную по сигналу средней интенсивности флуоресценции (MFI) после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две дозы соединения 1 (0,3 мг/кг или 0,03 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции), (ii) даратумумаб как единственное средство (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой или (v) группой изотипического контроля (0,5 мг/кг), как подробно описано в примере 11.

На фиг. 15А и 15В представлен график, иллюстрирующий % целевых 7-AAD+ клеток для клеток множественной миеломы человека, предварительно покрытых даратумумабом (+) (фиг. 15А) или ритуксимабом (+) (фиг. 15В), после стимуляции длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15) (+) или необработанных (-), как подробно описано в примере 12.

На фиг. 16 представлен график, иллюстрирующий процент выживаемости мышей SCID или мышей SCID beige, инокулированных клетками В-клеточной лимфомы Дауди с последующей обработкой с помощью следующего: (i) необработанный контроль для SCID (□), (ii) необработанный контроль для мышей SCID beige (○), (iii) комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 при 0,3 мг/кг и даратумумаба при 0,5 мг/кг, SC для мышей SCID (■) и (iv) комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 действия при 0,3 мг/кг и даратумумаба при 0,5 мг/кг, SC для мышей SCID beige (●), как подробно описано в примере 13.

На фиг. 17А представлен график, иллюстрирующий подсчитанные числа клеток Дауди в ткани костного мозга после обработки мышей, инокулированных В-клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб в высокой дозе (5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две низкие дозы длительно действующего агониста рецептора IL-15, т.е. моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) (0,03 мг/кг IV, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции) (◆), (ii) даратумумаб в высокой дозе как единственное средство (5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди) (▼), (iii) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 в низкой дозе как единственное средство (0,03 мг/кг IV, 14 и 21 дни после инокуляции) (▲) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой (●), как подробно описано в примере 14. На фиг. 17В представлен график, иллюстрирующий подсчитанные числа клеток Дауди в ткани костного мозга после обработки мышей, инокулированных В-

клетками Дауди, с помощью следующего: (i) даратумумаб в низкой дозе (0,05 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и две высокие дозы длительно действующего агониста рецептора IL-15, т.е. моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) (0,6 мг/кг IV, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции) (◆), (ii) даратумумаб в низкой дозе как единственное средство (0,05 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди) (▼), (iii) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 (соединение 1) как единственное средство в высокой дозе (0,6 мг/кг IV, 14 и 21 дни после инокуляции) (▲) по сравнению с (iv) необработанной контрольной группой (●), как подробно описано в примере 14.

На фиг. 18А представлен график, иллюстрирующий фракцию NK-клеток внутри опухоли в день 3 или день 5 после обработки мышей, несущих подкожные колоректальные опухоли толстой кишки НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 18В представлен график, иллюстрирующий подсчитанные числа NK-клеток внутри опухоли в день 3 или день 5 после обработки мышей, несущих подкожные опухоли НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 18С представлен график, иллюстрирующий пролиферацию NK-клеток, представленную с помощью % Ki67-положительных клеток в крови или клетках опухоли, после обработки мышей, несущих подкожные опухоли НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 18D представлен график, иллюстрирующий экспрессию гранзима В (% GzmB+) в клетках крови или клетках опухоли, после обработки мышей, несущих подкожные опухоли НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 18Е представлен график, иллюстрирующий поверхностную экспрессию CD16 на NK-клетках, измеренную по сигналу средней интенсивности флуоресценции (MFI) после обработки мышей, несущих подкожные опухоли НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 18F представлен график, иллюстрирующий фракцию NK-клеток внутри опухоли, экспрессирующих NKG2D (% NKG2D+) на поверхности клеток после обработки мышей, несущих подкожные опухоли НСТ-116, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 15.

На фиг. 19А представлен график, иллюстрирующий фракцию NK-клеток внутри опухоли в день 3 или день 5 после обработки мышей, несущих подкожные опухоли плоскоклеточной карциномы FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 19В представлен график, иллюстрирующий подсчитанные числа NK-клеток внутри опухоли в день 3 или день 5 после обработки мышей, несущих подкожные опухоли FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 19С представлен график, иллюстрирующий пролиферацию NK-клеток, представленную с помощью % Ki67-положительных клеток в крови или клетках опухоли, после обработки мышей, несущих подкожные опухоли FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 19D представлен график, иллюстрирующий экспрессию гранзима В (% GzmB+) в клетках крови или клетках опухоли, после обработки мышей, несущих подкожные опухоли FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 19Е представлен график, иллюстрирующий поверхностную экспрессию CD16 на NK-клетках, измеренную по сигналу средней интенсивности флуоресценции (MFI) после обработки мышей, несущих подкожные опухоли FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 19F представлен график, иллюстрирующий фракцию NK-клеток внутри опухоли, экспрессирующих NKG2D (% NKG2D+) на поверхности клеток после обработки мышей, несущих подкожные опухоли FaDu, цетуксимабом (20 мг/кг, IP) и конъюгатом 1 (0,3 мг/кг IV) по сравнению с контрольным носителем, как подробно описано в примере 16.

На фиг. 20 представлен график, иллюстрирующий относительный объем опухоли в течение 0-27 дней после обработки мышей, инокулированных клетками карциномы легкого H1975, с помощью следующего: (i) цетуксимаб (0,25 мг/кг, IP), вводимый на 9, 12 и 16 дни после инокуляции опухоли, и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV), вводимое на 9, 16 и 23 дни после инокуляции (p), (ii) цетуксимаб как единственное средство (0,25 мг/кг, IP, В1Wх3 (дважды в неделю)) (▲), (iii) соединение 1 как единственное

средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3 (каждые 7 дней x3)) (▼) по сравнению с контрольным носителем (●), как подробно описано в примере 17.

На фиг. 21А представлен график, иллюстрирующий относительный объем опухоли в течение 0-21 дней после обработки мышей, инокулированных клетками колоректальной карциномы HT-29, с помощью следующего: (i) цетуксимаб (40 мг/кг, IP, BIWx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (ρ), (ii) цетуксимаб как единственное средство (40 мг/кг, IP, BIWx3) (▲), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼) по сравнению с контрольным носителем (●), как подробно описано в примере 18.

На фиг. 21В представлен график, иллюстрирующий задержку роста опухоли (TVQT) как процент выживаемости мышей, инокулированных клетками колоректальной карциномы HT-29, и получавших лечение с помощью следующего: (i) цетуксимаб (40 мг/кг, IP, BIWx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼), (ii) цетуксимаб как единственное средство (40 мг/кг, IP, BIWx3) (■), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▲) по сравнению с контрольным носителем (●) в течение 0-23 дней после начала лечения (средний объем опухоли ~150 мм³), как подробно описано в примере 18.

На фиг. 22А представлен график, иллюстрирующий относительный объем опухоли в течение 0-19 дней после обработки мышей, инокулированных клетками колоректальной карциномы HCT-116, с помощью следующего: (i) цетуксимаб (40 мг/кг, IP, BIWx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (ρ), (ii) цетуксимаб как единственное средство (40 мг/кг, IP, BIWx3) (▲), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼), по сравнению с контрольным носителем PBS (OP, BIWx3) (●), как подробно описано в примере 19.

На фиг. 22В представлен график, иллюстрирующий задержку роста опухоли (TVQT) как процент выживаемости мышей, инокулированных клетками колоректальной карциномы HCT-116, и получавших лечение с помощью следующего: (i) цетуксимаб (40 мг/кг, IP, BIWx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (ρ), (ii) цетуксимаб как единственное средство (40 мг/кг, IP, BIWx3) (▲), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼) по сравнению с контрольным носителем (IP, BIWx3) (●), как подробно описано в примере 19.

На фиг. 23А представлен график, иллюстрирующий % целевых клеток CD45-EpCAM+7-AAD+ для клеток колоректальной карциномы HCT-116, предварительно покрытых цетуксимабом (+) отдельно, или после стимуляции с помощью соединения 1 (+), изотипического контроля (+), или необработанные (-), как подробно описано в примере 20.

На фиг. 23В представлен график, иллюстрирующий % целевых клеток CD45-7-AAD+ для клеток плоскоклеточной карциномы FaDu (HNSCC), предварительно покрытых цетуксимабом (+) отдельно, или после стимуляции с помощью соединения 1 (+), изотипического контроля (+), или необработанные (-), как подробно описано в примере 20.

На фиг. 24 представлен график, иллюстрирующий относительный объем опухоли в течение 0-35 дней после обработки мышей, инокулированных клетками аденокарциномы яичника SKOV-3, с помощью следующего: (i) трастузумаб (13,5 мг/кг, IV, BIWx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (ρ), (ii) трастузумаб как единственное средство (13,5 мг/кг, IV, BIWx3) (▲), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼) по сравнению с контрольным носителем (●), как подробно описано в примере 21.

На фиг. 25 представлен график, иллюстрирующий относительный объем опухоли в течение 0-35 дней после обработки мышей, инокулированных клетками карциномы желудка NCI-N87, с помощью следующего: (i) трастузумаб (3/1/1 мг/кг, IV, q7dx3) и соединение 1 (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (ρ), (ii) трастузумаб как единственное средство (3/1/1 мг/кг, IV, q7dx3) (▲), (iii) соединение 1 как единственное средство (0,3 мг/кг, IV, q7dx3) (▼) по сравнению с контрольным носителем (●), как подробно описано в примере 22.

Подробное описание

Перед подробным описанием одного или нескольких аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения следует отметить, что представленное изобретение не предназначено для ограничения конкретными методиками синтеза, фрагментами IL-15 и т.п., так как они могут варьировать, как будет понятно специалисту средней квалификации в данной 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.

Используемые в настоящем описании формы единственного числа предусматривают множественное число, если контекст явно не указывает на иное.

"Водорастворимый непептидный полимер" относится к полимеру, который растворим на по меньшей мере 35% (по весу), предпочтительно более чем на 70% (по весу) и более предпочтительно более чем на 95% (по весу) в воде при комнатной температуре. Обычно нефильтрованный водный препарат "водорастворимого" полимера пропускает по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 95% количества света, пропускаемого тем же раствором после фильтрации. Однако наиболее пред-

почтительно, чтобы водорастворимый полимер являлся растворимым в воде на по меньшей мере 95% (по весу) или полностью растворимым в воде. Что касается "непептидности", то полимер является непептидным, в случае если он содержит менее чем 35% (по весу) аминокислотных остатков.

Используемые в данном документе термин "РЕГ" или "полиэтиленгликоль" означают любой водорастворимый поли(этиленоксид). Если не указано иное, то "полимер РЕГ" или полиэтиленгликоль представляет собой полимер, в котором практически все (предпочтительно все) мономерные субъединицы являются субъединицами этиленоксида, хотя полимер может содержать отдельные, блокирующие конец фрагменты или функциональные группы, например для конъюгации. Полимеры РЕГ для применения в настоящем изобретении будут содержать одну из двух следующих структур $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ или $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$, в зависимости от того, был(и) ли замещен(ы) концевой(ые) атом(ы) кислорода, например, во время синтетического преобразования. Как указано выше, для полимеров РЕГ переменная (n) может варьироваться от приблизительно 3 до 4000, и концевые группы и архитектура всего РЕГ могут варьироваться. Иллюстративные или предпочтительные молекулы, содержащие РЕГ, могут однако содержать одну или несколько конкретных структур РЕГ, и/или линкеров, и/или диапазонов молекулярных масс.

Молекулярная масса в контексте водорастворимого полимера, такого как РЕГ, может выражаться либо как среднечисловая молекулярная масса, либо как средневесовая молекулярная масса. Если не указано иное, то все ссылки на молекулярную массу в данном документе относятся к средневесовой молекулярной массе. Оба определения молекулярной массы, среднечисловой и средневесовой, могут измеряться с использованием 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 РЕГ, 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.

"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 гидролизоваться 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, иминах, сложных ортоэфирах, пептидах, олигонуклеотидах, сложных тиоэфирах и карбонатах.

Ковалентная "обеспечивающая высвобождение" связь, например, в контексте полиэтиленгликоля, который может быть 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, с помощью любого подходящего механизма, со скоростью, которая является клинически применимой, и включает, например, без ограничения гидролизуемые связи и ферментативно разрушаемые связи.

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

"Стабильные" связывание или связь относятся к химической связи, которая является по сути стабильной 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 эфирах, амидах, аминах и т.п. Как правило, стабильная связь представляет собой такую, которая характеризуется степенью гидролиза в физиологических условиях, составляющей менее чем приблизительно 1-2% в день. Значения степени гидролиза иллюстративных химических связей можно найти в большинстве справочников по химии.

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

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

Термины "необязательный" или "необязательно" означают, 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", и "терапевтически эффективное количество", и "физиологически эффективное количество" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству длительно действующего агониста рецептора IL-15, представленного в данном документе, или к количеству моноклонального антитела, 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, и/или замедление или задержка прогрессирования рака у субъекта, и/или увеличение количества NK-клеток у пациента. Данный термин также используется в отношении дозы, 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 и конкретной комбинации, подлежащих введению, и т.п., и может быть легко определено специалистом в данной области.

Термин "фрагмент IL-15", используемый в данном документе, относится к пептидному или белковому фрагменту, обладающему активностью IL-15 человека. Кроме того, термин "фрагмент IL-15" охватывает как фрагмент IL-15, перед конъюгацией, так и остаток фрагмента, представляющего собой IL-15, после конъюгации. Как будет объясняться более подробно ниже, специалист средней квалификации 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 IL-15, а также любой белок или полипептид, по сути гомологичные им. Используемый в данном документе термин "фрагмент IL-15" включает такие пептиды и белки, которые модифицированы преднамеренно, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или случайным образом посредством мутаций. Эти 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 IL-15, полученные естественным, рекомбинантным и синтетическим способами. Фрагмент IL-15 может быть получен любым подходящим способом, известным из уровня техники. В вариантах осуществления фрагмент IL-15 рекомбинантно продуцируется в системе экспрессии *E. coli* или яичника китайского хомячка (CHO). Упоминание длительно действующего агониста рецептора IL-15, описанного в данном документе, подразумевается как охватывающее его фармацевтически приемлемые солевые формы.

Используемый в данном документе термин "антитело" подразумевается в широком смысле слова и включает гликопротеины, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig). Антитела включают поликлональные антитела, моноклональные антитела (например, мышинные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные), фрагменты антител и одноцепочечные антитела, которые специфически связываются с антигеном (например, опухолевым антигеном). Фрагмент антиген-связывающей (Fab) области содержит константный домен и по меньшей мере один переменный домен из каждой из тяжелой и легкой цепей. Антитела, как описано в данном документе, характеризуются по меньшей мере антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) в качестве механизма действия.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" (mAb) относится к не встречающимся в природе молекулам антител, полученным из популяции по сути гомогенных молекул, так что молекулы антител имеют по сути идентичные первичные последовательности, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными к одному сайту связывания или конкретному эпитопу. Моноклональное антитело является примером выделенного антитела. Моноклональные антитела можно получить с помощью различных средств, известных из уровня техники, включая без ограничения методики гибридомного культивирования, рекомбинантные способы и трансгенные способы.

Следует понимать, что последовательность целевого связывания антитела может быть изменена или модифицирована для улучшения аффинности к цели, для гуманизации последовательности целевого связывания, для улучшения ее получения в культуре клеток, для снижения ее иммуногенности *in vivo*, для создания мультиспецифического антитела, среди прочего. Такие измененные антитела конкретно рассматриваются в данном документе.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или восстановлено из компонента его естественного окружения.

Используемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к силе взаимодействия между сайтом связывания антигена антитела и его партнером по связыванию (например, антигеном). Аффинность антитела к его антигену обычно может быть представлена константой аффинности

(K_A), количеством комплекса антитело-антиген в равновесии или константой равновесной диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить с помощью любого известного из уровня техники способа, включая без ограничения ELISA, анализы задержки электрофоретического сдвига в геле, анализы с сосаждением, равновесный диализ, аналитическое ультрацентрифугирование, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), изотермическую титрационную калориметрию (ИТС) и спектроскопические анализы.

Термины "пациент" или "субъект", используемые в данном документе, относятся к живому организму, страдающему от состояния или подверженному ему, которое можно предупреждать или лечить с помощью 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.

Термины "по сути гомологичный" или "по сути идентичный" означают, 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 использования в данном документе включают последовательности, которые являются по сути гомологичными 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 фрагмента белка или полипептида, например, фрагмент IL-15, и характеризующийся биологической активностью или по сути характеризующийся биологической активностью белка или полипептида, например IL-15. Фрагменты включают белки или полипептиды, образуемые при протеолитическом разрушении, а также белки или полипептиды, образуемые химическим синтезом с помощью способов, общепринятых в данной области.

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

Среди прочего, настоящее изобретение направлено на обеспечение комбинаций, композиций, способов и наборов, относящихся к лечению состояний, таких как рак, содержащих (а) длительно действующий агонист рецептора IL-15 и (b) антитело, направленное против опухолевого антигена, где антитело, направленное против опухоли, предусматривает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в качестве механизма действия. Такие композиции и способы в идеале будут обладать несколькими полезными и непредсказуемыми характеристиками, такими как, например, по меньшей мере одно, если не больше, из следующего: повышенный клиренс опухоли; повышенная и/или длительная выживаемость пациента; повышенная активность одного или обоих из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела в случае введения в комбинации по сравнению с любым активным средством, вводимым по отдельности, в частности в компартменте целевой ткани; усиленная дегрануляция NK-клеток; повышенная пролиферация NK-клеток; повышенная жизнеспособность NK-клеток; повышенная пролиферация Т-лимфоцитов, например CD8+ Т-клеток, и/или повышенная жизнеспособность Т-лимфоцитов, например CD8+ Т-клеток. Неожиданно, заявители настоящего изобретения пришли к комбинации длительно действующего агониста рецептора IL-15 и по меньшей мере одного антитела (например, моноклонального антитела), направленного против опухолевого антигена, которая обладает уникальной комбинацией полезных свойств, которые более подробно будут описаны ниже и проиллюстрированы во вспомогательных примерах.

Было обнаружено, что комбинация длительно действующего агониста IL-15R, описанного в данном документе, и целевых антител, которые опосредуют уничтожение опухоли с помощью ADCC, характеризуется усиленным иммунотерапевтическим эффектом. ADCC является решающим механизмом истощения опухоли определенными антителами, нацеленными на опухоль, где рецепторы на NK-клетках распознают антитела, связанные с опухолевыми клетками. Повторное взаимодействие рецептора NK-клеток с антителом запускает высвобождение цитотоксических гранул и/или цитокинов для уничтоже-

ния опухолевых клеток. Было обнаружено, что описанные в данном документе длительно действующие агонисты IL-15R эффективны для повышения эффективности терапии на основе антител, нацеленных на опухоль, с механизмом действия ADCC с помощью размножения NK-клеток с повышенной цитотоксичностью и/или другой функциональной активацией.

Терапевтические комбинации, композиции и способы применения

В первом аспекте в данном документе описан способ лечения субъекта, страдающего от рака или опухоли. Способ предусматривает введение совместно или отдельно антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с опухолевым антигеном, и длительно действующего агониста рецептора IL-15. Благодаря способности длительно действующего агониста рецептора IL-15 индуцировать пролиферацию NK-клеток и активировать их способность уничтожать опухолевые клетки был разработан комбинированный терапевтический подход, в котором длительно действующий агонист рецептора IL-15, например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 (также называемый моно(mPEG-бутанамид)интерлейкин-15, моно(mPEG-бутанамид)IL-15 или моно-mPEG-SBA-IL15) объединены с терапевтическим моноклональным антителом, распознающим опухолевые клетки, чтобы создавать таким образом повышенное количество активированных NK-клеток, уничтожающих клетки, которые также могут эффективно связываться с молекулами антитела и затем могут направляться к опухолевым клеткам с помощью антител для обеспечения усиленного синергического уничтожения опухолевых клеток. См., например, результаты, описанные в прилагаемых в данном документе примерах.

Для ясности в отношении последовательности введения, где термин "введение" используется в данном случае для обозначения доставки либо длительно действующего агониста рецептора IL-15, либо антитела, направленного против опухоли, длительно действующий агонист рецептора IL-15 и антитело, направленное против опухоли, можно вводить одновременно или последовательно и в любом порядке. Более того, лечение с помощью любого компонента комбинации может предусматривать один цикл терапии или несколько циклов. Другими словами, после введения длительно действующего агониста IL-15 и введения антитела, направленного против опухоли, дополнительные раунды терапии могут включать введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 в комбинации с введением антитела, направленного против опухоли, введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 без дальнейшего введения антитела, направленного против опухоли, или введение антитела, направленного против опухоли, без дальнейшего введения длительно действующего агониста рецептора IL-15, или любую комбинацию вышеуказанных введений.

Во втором аспекте в данном документе описана композиция (или композиции), содержащая(-ие) антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с опухолевым антигеном и длительно действующим агонистом рецептора IL-15.

Как правило, описанные в данном документе антитела направлены против белка, экспрессируемого на поверхности раковой или опухолевой клетки, называемого в дальнейшем раковым антигеном или опухолевым антигеном. Из уровня техники известно много раковых или опухолевых антигенов. Неограничивающие примеры включают фосфопротеины, трансмембранные белки, гликопротеины, гликолипиды и факторы роста. Анализы для определения того, может ли данное соединение действовать как антитело к любому из антигенов или мишеней, как описано в данном документе, могут быть осуществлены с помощью стандартных экспериментов специалистом средней квалификации в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), обычно обнаруживаемое в кровотоке человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к CD16, антитело к CD19, антитело к CD20 или антитело к CD38, т.е. антитело, которое специфически связывается с CD16, CD19, CD20, CD30, CD38 или CD52.

Антиген CD19 человека представляет собой гликопротеин массой 95 кДа, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig). CD19 является биомаркером нормальных и неопластических В-клеток, а также фолликулярных дендритных клеток. CD19 экспрессируется на ранних стадиях развития пре-В-клеток через терминальную дифференцировку, с регуляцией развития и функции В-лимфоцитов. Экспрессия CD19 является высококонсервативной в большинстве В-клеточных опухолей, включая В-клеточные лимфомы, как например неходжкинская лимфома. CD19 также экспрессируется при большинстве типов лейкемии, включая В-клеточные лейкозы, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и макроглобулинемию Вальденстрема (WM). Большинство В-клеточных злокачественных новообразований (лимфомы и лейкемии) экспрессируют CD19 от нормального до высокого уровней. В вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело к CD19. Некоторые иллюстративные антитела к CD19, которые предполагаются для применения в способах и композициях, включенных в данный документ, включают без ограничения, и, например, антитело, связывающее B4-bR, BiTE (биспецифическое антитело-рекрутер Т-клеток), MEDI-551 (MedImmune, LLC), MOR-208 (MorphoSys AG), блинатумаб, биспецифическое антитело к CD19/CD3 BiTE® (Blincyto®, Amgen), колтуксимаб равансин (ImmunoGen Inc. и Sanofi), денинтузумаб мафодотин (Seattle Genetics), таплитумаб паптокс (National Cancer Institute), XmAb 5871 (Amgen и Xencor Inc.), MDX-1342 (Medarex), AFM11 (Affimed Therapeutics) и антитело к CD19, описанное в патенте США №

8691952 (huB4, DI B4, Merck). В одном или нескольких вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к CD19 используется для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, включая без ограничения неходжкинскую лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL) и макроглобулинемию Вальденстрема (WM).

CD20 представляет собой негликозилированный фосфопротеин размером примерно 33-37 кДа, который экспрессируется на поверхности почти всех нормальных и злокачественных В-клеток. mAb к CD20 могут оказывать противоопухолевый эффект посредством Fab-опосредованных эффектов, которые предусматривают активацию эффекторных механизмов (Bogoss et al., Am J Cancer 2(6):676-690, 2012). В одном или нескольких вариантах осуществления антитело, которое вводят с длительно действующим агонистом рецептора IL-15, как описано в данном документе, представляет собой моноклональное антитело к CD20. Некоторые иллюстративные антитела к CD20, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают ритуксимаб (Rituxan®, Genentech), офатумумаб (Arzerra®, Genmab AC), окрелизумаб (Genentech), велтузумаб (Immunomedics), АМЕ-133V (Eli Lilly), PRO131921 (Genentech), GA101 (Glycart/Roche), ибридумомаб тиуксетан (Zevalin), тозитумомаб (Веххар) и обинутузумаб (Gazyva®, Genentech). В вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15, такого как описанный в данном документе, и антитела к CD20 используется для лечения злокачественных В-клеточных новообразований, включая без ограничения неходжкинскую лимфому, CLL, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) и фолликулярную лимфому.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II размером 45 кДа, характеризующийся рецепторными, а также ферментативными функциями. CD38 обычно экспрессируется на низких уровнях в различных гематологических и солидных тканях, но экспрессируется на высоких уровнях плазматическими клетками (демонстрирует особенно обширные и высокие уровни экспрессии в опухолях плазматических клеток, как например множественная миелома (ММ)). CD38 также экспрессируется в подгруппе гематологических опухолей. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению предусматривает введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к CD38. Некоторые иллюстративные антитела к CD38, предполагаемые для применения в способах и композициях, представленных в данном документе, включают даратумумаб (DARZALEX®, Janssen Biotech), изатуксимаб (SAR650984, Sanofi Oncology) и MOR202 (Morphosys). В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к CD38 используется для лечения состояния, выбранного из множественной миеломы, CD38+ неходжкинской лимфомы, CDCLL, макроглобулинемии Вальденстрема, первичного системного амилоидоза, лимфомы из клеток мантии, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, НК-клеточного лейкоза, НК/Т-клеточной лимфомы и плазматического лейкоза.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинация на основе терапевтической иммуноонкологии включает длительно действующий агонист рецептора IL-15, описанный в данном документе, и антитело, направленное на гликопротеин, выбранный без ограничения из SLAMF7, EpCAM, gpA3 или связывающего фолат белка (FBP). В вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к SLAMF7, антитело к EpCAM, антитело к gpA3 или антитело к FBP.

Представитель 7 семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAMF7, ранее известный как CS1, CD319, CRACC) является представителем семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов. SLAMF7 экспрессируется на иммунных клетках, таких как В-клетки, Т-клетки, дендритные клетки, НК-Т-клетки и моноциты, а также на клетках множественной миеломы. В вариантах осуществления комбинации по настоящему изобретению антитело представляет собой моноклональное антитело к SLAMF7. Одним иллюстративным антителом к SLAMF7, предполагаемым для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, является элотузумаб (Emplicity™, Bristol-Myers Squibb). В вариантах осуществления комбинацию длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к SLAMF7 используют для лечения множественной миеломы.

Адгезивная молекула эпителиальных клеток (EpCAM) представляет собой трансмембранный гликопротеин, который экспрессируется многими эпителиальными раковыми клетками, включая опухоли желудочно-кишечного происхождения и некоторые формы рака мочеполовой системы. EpCAM экспрессируется, например, в карциноме толстой кишки человека, метастатическом раке молочной железы, раке желчного пузыря, раке яичников и раке поджелудочной железы. В вариантах осуществления терапевтической комбинации, представленной в данном документе, антитело представляет собой моноклональное антитело к EpCAM. Некоторые иллюстративные антитела к EpCAM, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают эдреколомаб (Panorex, Creative Biolabs), ING-1 (Хома), 3622W94 (Creative Biolabs) и адекватумумаб (Amgen). В одном или нескольких вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к EpCAM используется для лечения рака толстой кишки человека, метастатического рака молочной железы, рака желчного пузыря, рака яичников, аденокарциномы и рака поджелудочной железы.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления антитело направлено на фактор роста, выбранный без ограничения из, например, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR). В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из антитела к VEGF, антитела к VEGFR и антитела к EGFR.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой ангиогенный сигнальный белок размером 27 кДа. VEGF экспрессируется в большинстве типов рака, не связанных с пищеварением, а также типов рака пищеварительной системы, включая рак поджелудочной железы, рак груди, рак яичников, колоректальный рак и рак легкого. Некоторые иллюстративные антитела к VEGF, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают бевацизумаб (Avastin®, Genentech, Inc.), ранибизумаб, 2С3 и r84 (AT001, Affitech AS) и VEGF-Trap (афлиберцепт, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). В одном или нескольких вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к VEGF используется для лечения рака, такого как, например, рак поджелудочной железы, рак груди, рак яичника, колоректальный рак, метастатический почечно-клеточный рак и немелкоклеточный рак легкого.

Рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) представляет собой рецепторную тирозинкиназу (RTK), которая может индуцировать ангиогенез, увеличивать рост клеток и метастазирование и т.д. Семейство VEGFR имеет три основных подтипа: VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. Некоторые иллюстративные антитела к VEGFR, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают MF1/IMC-18F1 (ImClone Systems); IMC-1121B (ImClone Systems) и DC101/IMC-1C11. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к VEGFR используется для лечения рака, такого как, например, рак груди или немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления антитело к VEGFR используется для показания, указанного выше для антитела к VEGF.

Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) представляют собой большое семейство рецепторных тирозинкиназ, экспрессируемых при нескольких типах рака, включая рак груди, легкого, пищевода, метастатический колоректальный рак и рак головы и шеи. Некоторые иллюстративные антитела к EGFR, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают цетуксимаб (Erbix®, Lilly USA) и панитумумаб (Vectibix®, Amgen). В одном или нескольких конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (антитело к HER2). Некоторые иллюстративные антитела к HER2, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, включают гуманизованное моноклональное антитело трастузумаб (Herceptin®, Genentech, Inc.) и/или пертузумаб (Perjeta®, Genentech, Inc.). В некоторых связанных вариантах осуществления комбинация длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к EGFR используется для лечения рака, такого как рак груди (например, метастатический рак груди), легкого, пищевода, метастатический колоректальный рак и рак головы и шеи.

Также для применения в способах и комбинациях, представленных в данном документе, предусмотрено антитело к ВСМА (антиген созревания В-клеток, также обозначаемый как CD269). ВСМА является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR). ВСМА связывает фактор активации В-клеток (BAFF) и лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL). Сообщалось, что среди незлокачественных клеток ВСМА экспрессируется в основном в плазматических клетках и субпопуляциях зрелых В-клеток. РНК ВСМА была обнаружена в клетках множественной миеломы, а белок ВСМА был обнаружен на поверхности плазматических клеток пациентов с множественной миеломой. ВСМА экспрессируется или сверхэкспрессируется при различных формах рака человека. Примеры злокачественных опухолей, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют ВСМА, включают без ограничения лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому с острым лимфоцитарным лейкозом (ALL), лимфому Ходжкина и множественную миелому. Иллюстративные антитела к ВСМА описаны, например, в публикациях патентов США №№ 20120082661, 20170051068 и 20180318435 (содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в их полном объеме). Иллюстративные антитела к ВСМА включают ВСМАхXD3, описанные в Pillarisetti, K., et al., Blood, 2016, 128:2116, и часть гуманизованного антитела конъюгата лекарственного средства и антитела к ВСМА, GSK2857916.

В некоторых вариантах осуществления антитело может одновременно связывать более чем один специфический антиген, например, биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с любым из антител, описанных выше. Предполагается, что антитело, которое перекрестно конкурирует с любым из выше указанных антител, будет иметь аналогичные или одинаковые функциональные свойства.

В некоторых вариантах осуществления антитела для применения по настоящему документу представляют собой антигенсвязывающую часть любого из вышеописанных антител, поскольку из уровня техники хорошо известно, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами

полноразмерного антитела.

Обращаясь к длительно действующему агонисту рецептора IL-15 (IL-15R), как правило, предпочтительный длительно действующий агонист рецептора IL-15 или его фармацевтически приемлемая солевая форма содержат один фрагмент, представляющий собой линейный полиалкиленоксид (например, полиэтиленгликоль или "PEG"), стабильно ковалентно присоединенный к аминогруппе IL-15 с помощью амидной связи. Между фрагментом PEG и стабильной амидной связью с аминогруппой IL-15 находится линейная незамещенная алкиленовая группа ($\sim\text{CH}_2\sim$)_m, содержащая от 2 до 5 атомов углерода (т.е. m равняется 2, 3, 4 или 5). В одном или нескольких предпочтительных вариантах осуществления m равняется 3, так что стабильная амидная связь представляет собой бутанамид.

В одном или нескольких предпочтительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15R представляет собой (метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₆₀ кД-интерлейкин-15, более предпочтительно (метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₄₀ кД-интерлейкин-15 и еще более предпочтительно (метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15. В одном или нескольких предпочтительных вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15R представляет собой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₆₀ кД-интерлейкин-15, более предпочтительно моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₄₀ кД-интерлейкин-15 и еще более предпочтительно моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15. В одном предпочтительном варианте осуществления длительно действующий агонист IL-15R представляет собой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15.

Описанные в данном документе агонисты IL-15R, имеющие структуру, охватываемую формулой (I), и в частности моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15, сохраняют аффинность связывания с субъединицей рецептора IL-15 альфа (IL-15R α), а также субъединицами бета (β) и гамма (γ). Описанные в данном документе длительно действующие агонисты IL-15R присутствуют в комплексе IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ на тех же (цис) или соседних клетках (транс). Вовлечение комплекса IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ длительно действующими агонистами IL-15R, описанными в данном документе, может индуцировать пути Янускиназы/трансдуктора сигнала и активатора транскрипции-5 (JAK-STAT5), что увеличивает пролиферацию Т-клеток, выживаемость и/или активность. Длительно действующий агонист IL-15R дополнительно значительно усиливает пролиферацию и активацию CD8⁺ Т-клеток. Длительно действующие агонисты IL-15R предпочтительно характеризуются пониженным клиренсом по сравнению с соответствующими немодифицированными агонистами IL-15R. Не ограничиваясь теорией, постулируется, что присоединение PEG увеличивает гидродинамический объем фрагмента IL-15, что приводит к более длительному эффективному периоду полужизни, более низкой максимальной пиковой концентрации (C_{max}) и/или уменьшенному клиренсу по сравнению с неконъюгированным rhIL-15. Описанные в данном документе длительно действующие агонисты IL-15R обеспечивают устойчивую биологическую активность IL-15 без необходимости ежедневного дозирования.

При рассмотрении фрагмента, представляющего собой IL-15, термин "фрагмент IL-15" относится к фрагменту IL-15 до конъюгации, а также к фрагменту IL-15 после присоединения к непептидному водорастворимому полимеру, такому как 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 в случае если исходный фрагмент IL-15 присоединен к полиэтиленгликолевому фрагменту, то фрагмент IL-15 немного изменяется из-за присутствия одной или нескольких ковалентных связей, обусловленных связыванием с полимером(-ами).

Фрагмент IL-15 можно получать рекомбинантными способами и рекомбинантными способами, и настоящее изобретение не ограничено в данном отношении. Кроме того, фрагмент IL-15 может быть получен из человеческих источников, животных источников (включая насекомых), грибковых источников (включая дрожжи) и растительных источников.

Фрагмент IL-15 может быть получен в соответствии с процедурами, описанными, например, в (Grabstein et al. (1994) Science 264:965-968). Фрагмент IL-15 также может быть получен с применением рекомбинантных способов, таких как, например, те, что раскрыты в европейском патенте № 0772624 B2, принадлежащем Immunex Corporation. В качестве альтернативы фрагмент IL-15 можно коммерчески приобрести, например, у GenScript USA Inc. (Пискатауэй, Нью-Джерси, США) и Reprotech (Роки-Хилл, Нью-Джерси, США).

Фрагмент 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.

Дополнительные способы получения и/или очистки фрагмента IL-15 описаны в заявке согласно РСТ № РСТ/US2018/032817, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки в ее

полном объеме.

В зависимости от системы, используемой для экспрессии белков, обладающих активностью IL-15, фрагмент IL-15 может быть негликозилированным или гликозилированным, и при этом использоваться может любой из них. В одном или нескольких вариантах осуществления фрагмент IL-15 является негликозилированным.

Фрагмент 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 IL-15 описан в патенте США № 6177079. Кроме того, фрагмент 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 специалистам средней квалификации 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.

Дополнительные подходящие модификации и способы такой модификации фрагмента IL-15 описаны в заявке согласно РСТ № РСТ/US2018/032817, которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме. Примеры модификаций включают присоединение функциональной группы (кроме добавления аминокислотного остатка, содержащего функциональную группу), например, включение тиольной группы, N-концевого альфа-углерода, одного или нескольких углеводных фрагментов, альдегидной группы или кетонной группы. В некоторых вариантах осуществления является предпочтительным, чтобы фрагмент IL-15 не являлся модифицированным с включением одной или нескольких тиольных групп, N-концевого альфа-углерода, углевода, альдегидной группы или кетонной группы.

Иллюстративные фрагменты 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) *OncoImmunology* 2(11), e26442:1-3 и в заявке согласно РСТ № РСТ/US2018/032817, которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме. Предпочтительные фрагменты IL-15 включают таковые с аминокислотной последовательностью, включающей последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, и последовательности, по сути гомологичные им (где даже если SEQ ID NO: 2 и 3 и последовательности, по сути гомологичные им, не соответствуют стандарту активности *in vitro* фрагмента IL-15, представленного в данном документе, для целей настоящего изобретения будет понятно, что эти последовательности также рассматриваются как "фрагменты IL-15"). Предпочтительный фрагмент 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 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 IL-15 будет находиться в "мономерной" форме, где один продукт экспрессии соответствующего пептида организован в дискретную единицу. В других случаях фрагмент 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 IL-15 могут применяться формы-предшественники IL-15. Иллюстративная форма-предшественник IL-15 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист IL-15R представляет собой молекулу пегилированного IL-15, как описано в опубликованной заявке США № 2018/0360977, и, в частности, многоплечия PEG IL-15, как описано в ней.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент IL-15 представляет собой мутеин IL-15 или другую молекулу, родственную IL-15, как описано в патенте США № 10350270.

Усеченные версии, гибридные варианты и пептидные миметики любой из вышеуказанных последовательностей также могут служить в качестве фрагмента 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 IL-15.

Для любого указанного пептида, или белкового фрагмента, или конъюгата можно определить, характеризуется ли данный пептид, или белковый фрагмент, или конъюгат активностью 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, характеризующегося активностью IL-15, то происходит иницирование сигнального каскада, который включает в себя 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, Мэри-

ленд). Например, при использовании данного подхода представленный фрагмент IL-15, который характеризуется значением EC_{50} pSTAT5, составляющим не более чем приблизительно 300 нг/мл (более предпочтительно не более чем приблизительно 150 нг/мл) в течение по меньшей мере 5 мин или 10 мин, считается "фрагментом IL-15" в соответствии с настоящим изобретением. Однако предпочтительно, чтобы используемый фрагмент IL-15 был более эффективным (например, со значением EC_{50} pSTAT5, составляющим менее чем 150 нг/мл в течение по меньшей мере 5 мин или 10 мин, как например, менее чем приблизительно 1 нг/мл и еще более предпочтительно менее чем 0,5 нг/мл в течение по меньшей мере 5 мин или 10 мин).

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

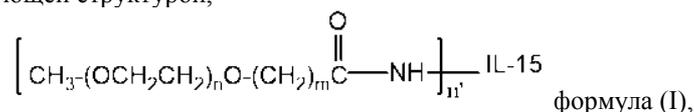
Анализы для использования в связи с измерением активности фрагмента IL-15 также можно использовать для измерения активности длительно действующих агонистов рецептора IL-15, описанных в данном документе. См., например, вспомогательные примеры, представленные в данном документе.

В соответствии с настоящим изобретением соединение считается длительно действующим агонистом рецептора IL-15 при условии, что после введения субъекту агонист проявляет агонизм в отношении IL-15R *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 использоваться для оценки того, является ли соединение, представленное как длительно действующий агонист рецептора IL-15, "длительно действующим" (т.е. имеет клиренс, который дольше такового у IL-15, вводимого в той же системе *in vivo*). Для целей данного документа характер длительно действующего агониста рецептора IL-15 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.

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

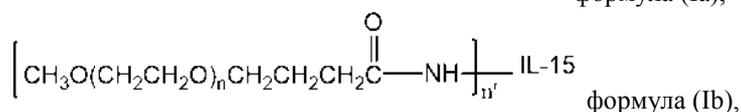
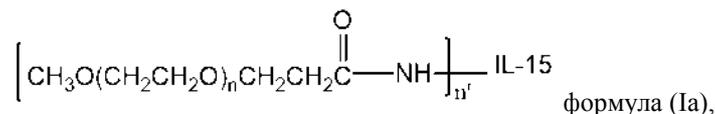
Например, в некоторых вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(\sim CH_2\sim)_2$; или в некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная алкиленовая группа представляет собой $(\sim CH_2\sim)_3$; еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления незамещенная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

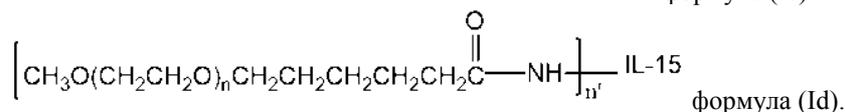
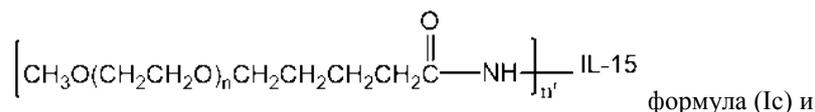
Например, в некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется следующей структурой,



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) $\sim NH\sim$ в структуре представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15. Формула (I) также может быть изображена следующим образом, где скобки сдвинуты, чтобы отобразить концевую

метоксигруппу PEG, $\left[CH_3O(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_m-C(=O)-NH \right]_{n'} IL-15$, 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, описанных 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 дополнительных 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.

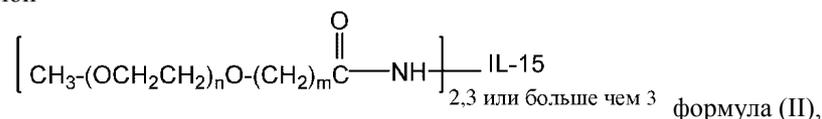
В одном или нескольких дополнительных вариантах осуществления n представляет собой целое число, имеющее значение, которое соответствует полиэтиленгликолевому полимеру, имеющему средневесовую молекулярную массу, выбранную из группы, состоящей из приблизительно 10000 дальтон (где n равняется ~227), или 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 ~907-909, например ~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 40000 дальтон, приблизительно 45000 дальтон, приблизительно 55000 дальтон, приблизительно 65000 дальтон, приблизительно 70000 дальтон и приблизительно 75000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса полиэтиленгликолевой части конъюгата IL-15 составляет от приблизительно 37000 до приблизительно 45000 дальтон.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса полиэтиленгликолевой полимерной части конъюгата IL-15 составляет приблизительно 40000 дальтон. Что касается каждой из формул (I) и (II), описанных в данном документе, включая любые их подформулы, то предпочтительной является средневесовая молекулярная масса PEG, составляющая 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 нижней C_1 -алкоксигруппой, или может оканчиваться гидроксильной группой или другой подходящей блокирующей конец группой.

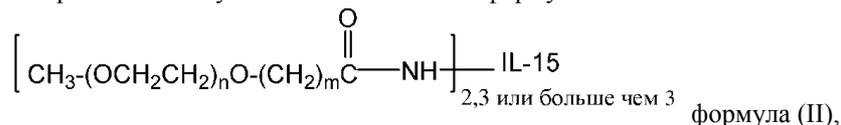
В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 содержит не более чем приблизительно 20 молярных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I). т.е. монопегилированный, длительно действующий агонист рецептора IL-15, например, любой из формул (I), (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), например формулы (Ib), например, в случае включения в композицию соединений длительно действующих агонистов рецептора IL-15, например, с той же химической формулой, но с разными количествами фрагментов PEG, ковалентно связанных с фрагментом интерлейкина-15 (например, 2-меры, 3-меры и т.д.), содержит не более чем приблизительно 20 молярных процентов длительно действующих агонистов рецептора IL-15 формулы (II).

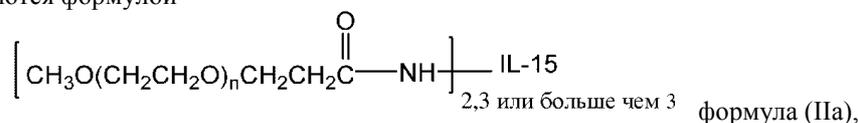
В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более чем приблизительно 15 молярных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции),

которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



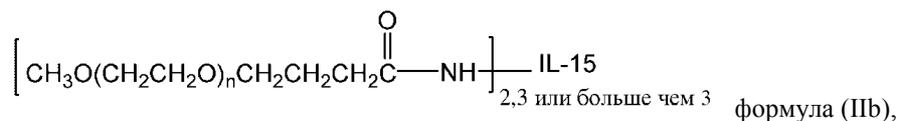
где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (I). То есть, что касается компонента таких композиций, представляющего собой длительно действующий агонист рецептора IL-15, то не более чем приблизительно 15 мол.% длительно действующих агонистов рецептора IL-15, содержащихся в композиции, представлены формулой (II). В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более чем приблизительно 0,1-20 мол.% соединений формулы (II). В вариантах осуществления композиции содержат не более чем 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). Предпочтительными вариантами осуществления являются те, в которых " m " в формуле (II) равняется 3.

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



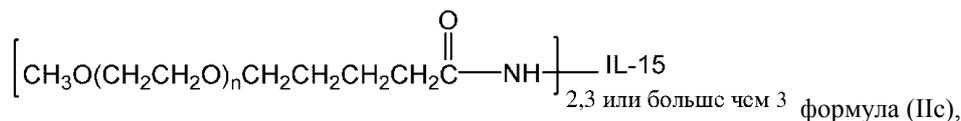
где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Ia).

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



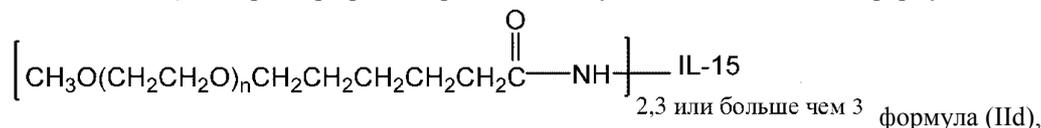
где значения n и m представлены в вышеприведенной формуле (Ib).

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



где 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 чем приблизительно 15 молярных процентов (мол.%) длительно действующих агонистов рецептора IL-15 (содержащих IL-15 молекул в композиции), которые при рассмотрении в совокупности охватываются формулой



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

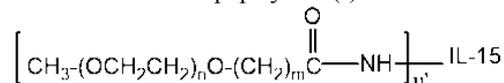
В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более чем приблизительно 0,1-20 мол.% соединений формулы (II), включая соединения формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId). В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиции содержат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

существованию соединений формулы (II) в композиции.

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

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

В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция содержит длительно действующий агонист рецептора IL-15 в соответствии с формулой (I)



где n и m являются такими, как 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 IL-15 выбрано из приблизительно 1,0, 1,1, 1,2 и приблизительно 1,3. То есть предпочтительный длительно действующий агонист рецептора IL-15 в соответствии с формулой (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 документе, " m " равняется 3.

Композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 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, т.е. 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 аминокетону в молекуле IL-15.

В то время как для получения длительно действующего агониста рецептора IL-15 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 рецептора IL-15, 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), при рассмотрении в совокупности охватываемых формулой (I), включая формулы (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), где особенно предпочтительной формулой является формула (Ib).

Подразумевается, что каждое соединение, описанное в данном документе, включая длительно действующий агонист рецептора IL-15, явным образом включает такие соединения в форме фармацевтически приемлемой соли. Как правило, такие соли (например, основного соединения) образуются путем реакции с фармацевтически приемлемой кислотой или эквивалентом кислоты. Термин "фармацевтически приемлемая соль" в данном отношении, как правило, будет относиться к относительно нетоксической соли присоединения неорганической или 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 без ограничения 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, толуолсульфоная, метансульфоная, этандисульфоная, щавелевая, изотионовая и т.п.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе длительно действующего агониста рецептора IL-15 содержит не более чем 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 чем приблизительно 0,5 мол.%, 1 мол.%, 2 мол.%, 3 мол.%, 4 мол.% или 5 мол.% свободного (т.е. неконъюгированного) IL-15.

Для получения длительно действующего агониста рецептора IL-15 фрагмент IL-15, например, может быть конъюгирован по своим аминокетам (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 аминокетам на фрагменте IL-15 в водных средах 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 чем 15°C) можно в результате получить присоединение фрагмента PEG в другом положении на фрагменте IL-15.

Иллюстративные способы получения и/или очистки длительно действующего агониста рецептора IL-15 описаны в заявке согласно РСТ № РСТ/US 2018/032817, например, в примерах 1-2, которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме. В одном иллюстративном варианте осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15, как правило, может быть получен путем введения в реакцию интерлейкина-15, например очищенного IL-15, такого как рекомбинантный IL-15, с реагентом, представляющим собой активированный PEG, таким как активированный сложный эфир, метокси-PEG-сукцинимидилбутаноат, mPEG-SBA. Другие подходящие активированные реагенты PEG включают метокси-PEG-сукцинимидилпропионат, метокси-PEG-сукцинимидилпетаноат и метокси-PEG-сукцинимидилгексаноат. Хотя используют, как правило, могут использоваться сукцинимидильная активирующая группа, любая подходящая активная или активирующая сложноэфирная группа, где такая реагирующая группа подходит для образования требуемой стабильной амидной связи. Для получения требуемого продукта продукт реакции, представляющий собой пегилированный IL-15, как правило, может затем быть очищен любым подходящим способом, таким как, например, ионообменная хроматография. Например, может использоваться 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, аминокетамы во фрагменте, представляющем собой IL-15, обеспечивают участок связывания между фрагментом IL-15 и фрагментом полиэтиленгликоля с обеспечением длительно действующих агонистов рецептора IL-15, таких как охватываемые формулой (I). При рассмотрении иллюстративных аминокетамных последовательностей IL-15, представленных в данном документе, очевидно, что имеется семь остатков лизина, каждый из которых характеризуется наличием ϵ -аминокетамы, которая может быть доступна для конъюгации для по меньшей мере SEQ ID NO: 1 и 2. 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 Lys¹⁰ и Lys¹¹ (с использованием нумерации, показанной в SEQ ID NO: 2, в качестве примера или Lys¹¹ и Lys¹² 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, Lys³⁷ или Lys⁴² из SEQ ID NO: 1) для фрагмента PEG. В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора интерлейкина-15 предусматривает смесь позиционных изомеров, где ковалентное присоединение полиэтиленгликолевого фрагмента преимущественно происходит на N-конце (т.е. из всей совокупности позиционных изомеров изомер с фрагментом PEG, присоединенным на N-конце, присутствует в наибольшем количестве по сравнению с другими позиционными изомерами).

Если требуется, пул продуктов может быть далее разделен на позиционные изомеры посредством обращенно-фазовой хроматографии с использованием подходящей колонки (например, колонки C18 или колонки C3, коммерчески доступных от компаний, таких как Amersham Biosciences или Vydac), или с

помощью ионообменной хроматографии с использованием ионообменной колонки, например, ионообменной 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).

Было обнаружено, что длительно действующие агонисты рецептора IL-15 по настоящему изобретению 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 рецептора IL-15 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 рецептора IL-15 в соответствии с вышеизложенными характеристиками описаны в данном документе и в заявке PCT № PCT/US 2018/032817, которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме.

Количество длительно действующего агониста рецептора IL-15, 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 определить экспериментально с помощью повторного введения повышающихся количеств длительно действующего агониста рецептора IL-15 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, а затем определения диапазона, при котором достигается оптимальная эффективность при отсутствии существенных неблагоприятных эффектов.

Каждый фармакологический компонент по настоящему способу можно вводить отдельно. Альтернативно, если требуется, чтобы введение двух фармакологических компонентов было одновременным, и эти два фармакологических компонента были совместимы друг с другом и в данном составе, тогда одновременное введение может быть достигнуто с помощью введения однократной лекарственной формы/состава (например, внутривенное введение состава для внутривенного введения, содержащего оба фармакологически активных средства). Специалист средней квалификации в данной области техники может определить с помощью стандартного тестирования, совместимы ли два заданных фармакологических компонента друг с другом и в данном составе. Следует понимать, что антитело и длительно действующий агонист рецептора IL-15 можно вводить в любом порядке. Кроме того, введение антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15 может быть разделено на минуты, часы или дни, если необходимо.

Что касается частоты введения длительно действующего агониста рецептора IL-15, то специалист средней квалификации в данной области техники сможет определить подходящую частоту. Например, клиницист может решить вводить длительно действующий агонист рецептора IL-15 относительно нечасто (например, один раз каждые две или три недели) и постепенно сокращать период между дозами, в зависимости от переносимости пациентом. Что касается частоты введения антитела, то частота введения этих средств может быть определена аналогичным образом. Кроме того, поскольку некоторые длительно действующие агонисты рецепторов IL-15 и антитела, описанные в данном документе, находятся либо в стадии расширенных клинических испытаний, либо являются коммерчески доступными, то можно также обратиться к литературе для получения подходящей частоты введения (имея в виду, что может потребоваться некая корректировка ввиду комбинированного воздействия схемы лечения).

В некоторых схемах лечения длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде однократной дозы в начале лечения. Антитело вводят либо одновременно с длительно действующим агонистом рецептора IL-15, до введения длительно действующего агониста рецептора IL-15, либо после введе-

ния длительно действующего агониста рецептора IL-15. Например, при некоторых процедурах лечения антитело вводят в течение 7-14 дней (до или после) введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, в любой из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14), где день 1 указывает на начало лечения. Основываясь на длительно действующей природе длительно действующего агониста рецептора IL-15, такое соединение можно вводить относительно нечасто (например, один раз каждые три недели, один раз каждые две недели, один раз каждые 8-10 дней, один раз в неделю, один раз каждые три дня и т. д.). Кроме того, антитело можно вводить в соответствии с утвержденными режимами (например, ежедневно, два или три раза в неделю, еженедельно, каждые две недели и т.д.). В одном иллюстративном режиме длительно действующий агонист IL-15R вводят в первый день и каждый 21 день после этого. Антитело вводят еженедельно, каждые две недели или ежемесячно, начиная с 7-14 дней после введения длительно действующего агониста IL-15R. Следует понимать, что режим дозирования одного или обоих из длительно действующего агониста IL-15R и антитела может быть скорректирована в течение периода лечения. Например, длительно действующий агонист IL-15R и/или антитело можно вводить еженедельно в течение определенного периода времени (например, 4-8 недель), а затем каждые две недели или ежемесячно в течение определенного периода времени после этого.

Описанный в данном документе способ лечения может продолжаться до тех пор, пока клиницист, наблюдающий пациента, продолжает считать, что данный способ лечения эффективен. Неограничивающие параметры, указывающие на эффективность способа лечения, включают следующее: уменьшение опухоли (по весу и/или объему); уменьшение количества отдельных опухолевых колоний; устранение опухоли и выживаемость без прогрессирования.

Иллюстративные отрезки времени, связанные с курсом терапии, описанной в данном документе, включают следующее: приблизительно одна неделя; две недели; приблизительно три недели; приблизительно четыре недели; приблизительно пять недель; приблизительно шесть недель; приблизительно семь недель; приблизительно восемь недель; приблизительно девять недель; приблизительно десять недель; приблизительно одиннадцать недель; приблизительно двенадцать недель; приблизительно тринадцать недель; приблизительно четырнадцать недель; приблизительно пятнадцать недель; приблизительно шестнадцать недель; приблизительно семнадцать недель; приблизительно восемнадцать недель; приблизительно девятнадцать недель; приблизительно двадцать недель; приблизительно двадцать одна неделя; приблизительно двадцать две недели; приблизительно двадцать три недели; приблизительно двадцать четыре недели; приблизительно семь месяцев; приблизительно восемь месяцев; приблизительно девять месяцев; приблизительно десять месяцев; приблизительно одиннадцать месяцев; приблизительно двенадцать месяцев; приблизительно тринадцать месяцев; приблизительно четырнадцать месяцев; приблизительно пятнадцать месяцев; приблизительно шестнадцать месяцев; приблизительно семнадцать месяцев; приблизительно восемнадцать месяцев; приблизительно девятнадцать месяцев; приблизительно двадцать месяцев; приблизительно двадцать один месяц; приблизительно двадцать два месяца; приблизительно двадцать три месяца; приблизительно двадцать четыре месяца; приблизительно двадцать пять месяцев; приблизительно три года; приблизительно четыре года и приблизительно пять лет. Следует понимать, что частота дозирования антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15 может быть одинаковой или различной. Кроме того, частота или схема дозирования антитела и/или длительно действующего агониста рецептора IL-15 могут быть разработаны таким образом, чтобы обеспечить устойчивую занятость рецептора/устойчивое связывание с антигеном, при необходимости.

Необязательно, антитело и/или длительно действующий агонист рецептора IL-15 включены в композицию, которая также содержит один 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, целлюбиоза 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 может также включать неорганическую соль или буфер, такие как лимонная кислота, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат калия, сульфат натрия, нитрат калия, одноосновный фосфат натрия, двухосновный фосфат натрия и их комбинации.

Композиция или композиции также могут 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 фенилтрети, тимеросал и их комбинации.

Также в композиции может присутствовать антиоксидант. Антиоксиданты используются для пре-

дотвращения окисления, тем самым предупреждая разложение конъюгата или других компонентов препарата. Подходящие антиоксиданты для использования в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения включают, например, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, фосфорноватистую кислоту, моноиоглицерин, пропилгаллат, бисульфит натрия, формальдегидсульфоксилат 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, США); сложные эфиры сорбитана; липиды, такие как фосфолипиды, такие как лецитин и другие фосфатидилхолины, фосфатидилэтанолламины (однако предпочтительно не находящиеся в липосомальной форме), жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот; стероиды, такие как холестерин; и хелатирующие IL-15 средства, такие как EDTA, цинк и другие подходящие катионы.

В качестве вспомогательного вещества в композиции могут присутствовать кислоты или основания. Неограничивающие примеры кислот, которые можно использовать, 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.

В некоторых вариантах осуществления длительно действующий агонист рецептора IL-15 содержится в композиции, содержащей фосфат калия и трегалозу. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой жидкий состав, содержащий стерильную воду для инъекций. В некоторых других вариантах осуществления композиция представляет собой лиофилизированный порошок, подходящий для восстановления.

В соответствии с описанным в данном документе способом длительно действующий агонист рецептора IL-15 и антитело вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. Специалист средней квалификации в данной области техники может определить, какое количество данного длительно действующего агониста рецептора IL-15 и/или антитела достаточно для обеспечения клинически значимого количества (например, соответственно агонистическая активность рецептора IL-15 или связывание антитела с представляющим интерес рецептором/антигеном). Например, специалист средней квалификации в данной области техники может обратиться к литературе и/или вводить серию увеличивающихся количеств длительно действующего агониста рецептора IL-15 и определить, какое количество или количества обеспечивают клиническую агонистическую активность IL-15. Следует понимать, что терапевтическое количество одного или обоих из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела может быть ниже, чем терапевтически эффективное количество любого компонента в случае введения отдельно. Синергизм введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 в комбинации с антителом, описанного в данном документе, обеспечивает возможность введения либо более низкой дозы (одного или обоих компонентов комбинации), либо обеспечивает большую эффективность при дозе для любого компонента, определенного отдельно. Как правило, терапевтически эффективное количество антитела находится в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг включительно. В некоторых конкретных неограничивающих вариантах осуществления антитело вводят или включают в композицию в дозе, составляющей приблизительно 0,01-50 мг/кг, приблизительно 0,05-50 мг/кг, приблизительно 0,1-50 мг/кг, приблизительно 0,5-50 мг/кг, приблизительно 1-50 мг/кг, приблизительно 5-50 мг/кг, приблизительно 10-50 мг/кг, приблизительно 15-50 мг/кг, приблизительно 20-50 мг/кг, приблизительно 30-50 мг/кг, приблизительно 40-50 мг/кг, приблизительно 0,01-40 мг/кг, приблизительно 0,05-40 мг/кг, приблизительно 0,1-40 мг/кг, приблизительно 0,5-40 мг/кг, приблизительно 1-40 мг/кг, приблизительно 5-40 мг/кг, приблизительно 10-40 мг/кг, приблизительно 15-40 мг/кг, приблизительно 20-40 мг/кг, приблизительно 30-40 мг/кг, приблизительно 0,01-30 мг/кг, приблизительно 0,05-30 мг/кг, приблизительно 0,1-30 мг/кг, приблизительно 0,5-30 мг/кг, приблизительно 1-30 мг/кг, приблизительно 5-30 мг/кг, приблизительно 10-30 мг/кг, приблизительно 15-30 мг/кг, приблизительно 20-30 мг/кг, приблизительно 0,05-25 мг/кг, приблизительно 0,1-25 мг/кг, приблизительно 0,5-25 мг/кг, приблизительно 1-25 мг/кг, приблизительно 5-25 мг/кг, приблизительно 10-25 мг/кг, приблизительно 15-25 мг/кг, приблизительно 20-25 мг/кг, приблизительно 0,01-20 мг/кг, приблизительно 0,05-20 мг/кг, приблизительно 0,1-20 мг/кг, приблизительно 0,5-20 мг/кг, приблизительно 1-20 мг/кг, приблизительно 5-20 мг/кг, приблизительно 10-20 мг/кг, приблизительно 15-20 мг/кг, приблизительно 0,01-15 мг/кг, приблизительно 0,05-15 мг/кг, приблизительно

но 0,1-15 мг/кг, приблизительно 0,5-15 мг/кг, приблизительно 1-15 мг/кг, приблизительно 5-15 мг/кг, приблизительно 10-15 мг/кг, приблизительно 0,01-10 мг/кг, приблизительно 0,05-10 мг/кг, приблизительно 0,1-10 мг/кг, приблизительно 0,5-10 мг/кг, приблизительно 1-10 мг/кг, приблизительно 5-10 мг/кг, приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,5-5 мг/кг, приблизительно 1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,5-1 мг/кг или приблизительно 0,1-0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг. Следует понимать, что терапевтически эффективное количество антитела может представлять собой любую дозу, одобренную государственным регулирующим органом.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ритуксимаб, и терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100 мг/м²-750 мг/м² на введение включительно. В вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 150 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 200 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 375 мг/м²-500 мг/м² или приблизительно 400 мг/м²-500 мг/м² на введение. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 100 мг/м², приблизительно 150 мг/м², приблизительно 200 мг/м², приблизительно 250 мг/м², приблизительно 375 мг/м², приблизительно 400 мг/м², приблизительно 500 мг/м² или приблизительно 750 мг/м².

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой даратумумаб, и терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 10 мг/кг - 50 мг/кг на введение включительно. В вариантах осуществления терапевтически эффективное количество находится в диапазоне приблизительно 10-25 мг/кг, приблизительно 10-20 мг/кг, приблизительно 10-16 мг/кг, приблизительно 10-15 мг/кг, приблизительно 15-50 мг/кг, приблизительно 15-25 мг/кг, приблизительно 15-20 мг/кг, приблизительно 16-50 мг/кг, приблизительно 16-25 мг/кг или приблизительно 16-20 мг/кг на введение. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на введение.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой цетуксимаб и терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100 мг/м²-750 мг/м² на введение включительно. В вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 150 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 200 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 250 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 400 мг/м²-500 мг/м², приблизительно 200 мг/м²-400 мг/м², приблизительно 250 мг/м²-400 мг/м² или приблизительно 300 мг/м²-400 мг/м² на введение. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 100 мг/м², приблизительно 150 мг/м², приблизительно 200 мг/м², приблизительно 250 мг/м², приблизительно 400 мг/м², приблизительно 500 мг/м² или приблизительно 750 мг/м².

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой трастузумаб, и терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 1 мг/кг - 20 мг/кг на введение. В вариантах осуществления терапевтически эффективное количество находится в диапазоне приблизительно 2-20 мг/кг, приблизительно 2-15 мг/кг, приблизительно 2-10 мг/кг, приблизительно 2-8 мг/кг, приблизительно 2-6 мг/кг, приблизительно 2-4 мг/кг, приблизительно 4-10 мг/кг, приблизительно 4-8 мг/кг, приблизительно 4-6 мг/кг, приблизительно 6-10 мг/кг, приблизительно 6-8 мг/кг или приблизительно 8-10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг.

Будет понятно, что доза может быть определена с помощью известных из уровня техники способов, а конкретная доза может быть установлена регулирующим органом. 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.).

Как правило, терапевтически эффективное количество длительно действующего агониста рецептора IL-15 будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 мг до приблизительно 100 мг или от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 100 мг, предпочтительно в дозах от приблизительно 0,01 мг/день до приблизительно 75 мг/день и более предпочтительно в дозах от приблизительно 0,10 мг/день до приблизительно 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 эффективное количество длительно действующего агониста IL-15R составляет приблизительно 0,25-25 мкг/кг. В других вариантах осуществления терапевтически эффективная доза находится в диапазоне (например, в день) от приблизительно 0,25 мкг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,375 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от

приблизительно 0,375 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 0,375 мкг/кг до приблизительно 10 мкг/кг, от приблизительно 0,375 мкг/кг до приблизительно 5,0 мкг/кг, от приблизительно 0,375 мкг/кг до приблизительно 1,5 мкг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 10 мкг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 5,0 мкг/кг, от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 1,5 мкг/кг, от приблизительно 1,5 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 1,5 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 1,5 мкг/кг до приблизительно 10 мкг/кг, от приблизительно 1,5 мкг/кг до приблизительно 5,0 мкг/кг, от приблизительно 5,0 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 5,0 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 5,0 мкг/кг до приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 10, от приблизительно 1,5 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 15 мкг/кг, от приблизительно 15 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг в день или от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг в день. В других вариантах осуществления терапевтически эффективная доза варьирует от приблизительно 1-10 мкг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых конкретных неограничивающих вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет приблизительно 0,25 мкг/кг, приблизительно 0,3 мкг/кг, приблизительно 0,375 мкг/кг, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 0,75 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 1,5 мкг/кг, приблизительно 2 мкг/кг, приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 4 мкг/кг, приблизительно 4,5 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 6 мкг/кг, приблизительно 7 мкг/кг, приблизительно 8 мкг/кг, приблизительно 9 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 20 мкг/кг, приблизительно 25 мкг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг в день.

Следует понимать, что описанные выше дозы длительно действующего агониста IL-15R могут относиться к конъюгату или его белковому эквиваленту. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления дозы указаны в белковых эквивалентах.

В вариантах осуществления уровень дозы антитела и/или длительно действующего агониста IL-15R может быть снижен, в случае если он сопровождается увеличенной дозой антитела или длительно действующего агониста IL-15R соответственно. Как показано в примере 14, снижение уровня дозы для лечения антителом или длительно действующим агонистом IL-15R было компенсировано связанным увеличением уровня дозы агониста длительно действующего IL-15R или антитела, соответственно, на мышинной модели опухоли. Таким образом, введение низкой дозы антитела в комбинации с высокой дозой длительно действующего агониста IL-15R, а также введение высокой дозы антитела в комбинации с низкой дозой длительно действующего агониста IL-15R, оба были эффективны в снижении количества клеток Дауди в костном мозге мышинной модели опухоли.

Со ссылкой на дозы, указанные в приведенных в данном документе примерах, специалист средней квалификации в данной области техники смог бы преобразовать дозы для животных (например, мыши) в соответствующую дозу для людей с использованием преобразований, известных из уровня техники (например, Nair et al., *J. Basic and Clin. Pharmacy* (2016) 7:27-31).

Единицу дозирования любого указанного антитела и/или конъюгата (в данном случае также предпочтительно предусматриваемого в качестве части фармацевтического препарата) можно вводить в нескольких режимах дозирования в зависимости от решения клинициста, потребностей пациента и т.д. Конкретная схема дозирования будет известна специалисту средней квалификации в данной области техники или ее можно определить экспериментально с применением обычных способов. Иллюстративные схемы 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, каждые 28 дней или каждый 21 день) и любую их комбинацию. Следует понимать, что схема дозирования может быть скорректирована по мере необходимости, например, введение один раз в неделю в течение определенного периода времени, а затем при необходимости корректировка до более короткой или более длительной схемы. Как только требуемый 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.

Фактическая доза антитела или длительно действующего агониста рецептора IL-15, 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.

Комбинация антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15 подходит для введения пациенту, страдающему от рака или опухоли. Способ предусматривает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, направленного против опухолевого антигена, и, как правило парентерально, терапевтически эффективного количества длительно действующего агониста рецептора IL-

15 (предпочтительно предоставляемого как часть той же или другой фармацевтических композиций).

Антитело и/или длительно действующий агонист рецептора IL-15 можно вводить с помощью любых подходящих способов, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15 можно вводить парентерально, что включает подкожные, внутривенные, внутриартериальные, внутрибрюшинные, внутрисердечные, интратекальные и внутримышечные инъекции, а также инфузионные инъекции. 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 антитело и/или длительно действующий агонист рецептора IL-15 предоставляется в составе, подходящем для внутривенного введения, и вводится внутривенно. В некоторых других вариантах осуществления антитело и/или длительно действующий агонист рецептора IL-15 предусмотрены в составе, подходящем для подкожного введения, и вводятся подкожно. В некоторых дополнительных вариантах осуществления одно или оба из антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15 вводятся внутривоухолево. Также предусмотрены другие способы введения, такие как легочный, назальный, буккальный, ректальный, сублингвальный и трансдермальный.

Способ введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, предоставляемого в качестве части фармацевтической композиции) необязательно можно осуществлять 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.

Как описано в данном документе, в одном аспекте настоящего изобретения представлен способ, который применим (среди прочего) для лечения пациента, страдающего от состояния, которое поддается лечению с помощью одного или обоих соединений. Например, пациенты могут отвечать только на отдельные средства, а также на комбинацию, однако являются более чувствительными к комбинации. В качестве дополнительного примера пациенты могут не отвечать на одно из отдельных средств, однако отвечать на комбинацию. В качестве еще одного примера пациенты могут не отвечать ни на одно из отдельных средств по отдельности, однако отвечать на комбинацию.

Как используется в данном документе в отношении лечения субъекта, у которого имеется 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. Кроме того, термин "лечение рака" не предназначен для использования в качестве абсолютного термина и может включать, например, уменьшение размера опухоли или количества раковых клеток, приведение рака к ремиссии или предупреждение роста размера или роста количества раковых клеток и т.п. В некоторых случаях лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к улучшенному прогнозу.

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 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.

Используемый в данном документе термин "усиленный" или "усиливающий", например, в контексте усиленного ответа, относится к улучшенной способности субъекта или опухолевой клетки отвечать на лечение, например, как раскрыто в данном документе, по сравнению с данным исходным уровнем или соответствующей терапией. Например, усиленный ответ может предусматривать увеличение ответа на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% или больше на основании любого одного или нескольких индикаторов ответа на

лечение. Используемые в данном документе термины "усиленный" или "усиливающий" могут также относиться к увеличению числа субъектов, которые положительно отвечают на лечение, например, по сравнению с заданной базой для такого сравнения.

Типичными состояниями являются формы 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, колоректальный рак, эпителиальный рак, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома (включая, например, увеальную меланому, меланому слизистой оболочки и лептоменингеальную меланому), нейробластома, ретинобластома, плоскоклеточный рак головы и шеи, лейкозы и лимфомы. Другими примерами состояний являются гематологические злокачественные новообразования, включая без ограничения неходжкинскую лимфому и множественную миелому.

В одном конкретном способе моноклональное антитело и длительно действующий агонист рецептора IL-15 используются для лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как лейкоз или лимфома. В еще одном способе моноклональное антитело и длительно действующий агонист рецептора IL-15 используются для лечения солидного рака. В некоторых вариантах осуществления солидный рак без ограничения выбран из рака толстой кишки, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака груди, рака яичника, рака простаты, рака головы и шеи, почечно-клеточного рака, рака шейки матки и мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого.

В некоторых вариантах осуществления комбинация антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 (или связанной композиции) является эффективной в случае введения субъекту в терапевтически эффективной дозе для стимуляции активации и/или пролиферации NK в большей степени, чем наблюдаемая для любого средства, вводимого отдельно и в эквивалентной дозе, например, в подходящей животной модели. В некоторых вариантах осуществления комбинация моноклонального антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 или композиции является эффективной в случае введения субъекту в терапевтически эффективной дозе для обеспечения повышенного клиренса опухоли по сравнению с тем, который наблюдается для любого средства, вводимого отдельно и в эквивалентной дозе, например, в случае оценки на подходящей животной модели. В некоторых вариантах осуществления комбинация моноклонального антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 или композиции является эффективной в случае введения субъекту в терапевтически эффективной дозе для обеспечения повышенной и/или длительной выживаемости субъекта, например, увеличения выживаемости или большей степени регрессии опухоли, чем наблюдаемая для любого средства, вводимого отдельно и в эквивалентной дозе, например, в случае оценки на подходящей животной модели. В некоторых вариантах осуществления комбинация антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 или композиции является эффективной в случае введения субъекту в терапевтически эффективной дозе для обеспечения увеличения активности одного или обоих из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, в частности, в тканевом компартменте, таком как, например, костный мозг. В некоторых вариантах осуществления комбинация антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 или композиции является эффективной в случае введения субъекту в терапевтически эффективной дозе для обеспечения усиленной дегрануляции NK-клеток и/или повышения жизнеспособности NK-клеток. В вариантах осуществления введение антитела, описанного в данном документе, и длительно действующего агониста рецептора IL-15 или композиции является эффективным в случае введения в терапевтически эффективной дозе субъекту для лечения рака, устойчивого к лечению с помощью моноклонального антитела отдельно.

Известные результаты, связанные с комбинированной терапией, описанной в данном документе, выделены ниже и дополнительно подробно описаны в иллюстративных примерах, включенных в данный документ. В иллюстративной мышинной модели В-клеточной лимфомы Дауди, как описано в примере 1, введение иллюстративного длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к CD20 ритуксимаба было эффективным для продления выживаемости по сравнению с введением любого из длительно действующего агониста рецептора IL-15 или антитела отдельно. Как показано на фиг. 1, мыши, обработанные с помощью длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к CD20 ритуксимаба, через приблизительно 45 дней характеризовались 100% выживаемостью. У мышей, которым вводили изотипический контроль или только ритуксимаб, выживаемость через приблизительно 30 дней составила 0%. Мыши, получавшие изотипический контроль и длительно действующий агонист рецептора IL-15, через приблизительно 35 дней характеризовались 0% выживаемостью. В еще одной ил-

люстративной мышинной модели, описанной в примере 2, введение длительно действующего агониста IL-15R (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба было эффективным для продления выживаемости по сравнению с введением любого из длительного действующего агониста рецептора IL-15 или антитела отдельно. Как показано на фиг. 5, мыши, получавшие иллюстративный длительно действующий агонист рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15) и антитело к CD38 даратумумаб характеризовались медианой выживаемости, составляющей 55 дней (после инъекции опухоли), по сравнению с 28,5 днями для антитела как отдельного средства. Как описано в примере 13, введение длительно действующего агониста IL-15R (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба мышам SCID приводило к более чем двукратному увеличению выживаемости. Напротив, введение длительно действующего агониста IL-15R и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба мышам SCID beige, у которых снижена функциональность NK-клеток, приводило к снижению выживаемости. Эти результаты показывают, что влияние на функциональность NK-клеток с помощью введения длительно действующего агониста IL-15R и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба приводит к более длительной выживаемости. Примеры 18 и 19 демонстрируют увеличение выживаемости в случае введения длительно действующего агониста IL-15R (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба на двух типичных мышинных моделях с колоректальной карциномой (модель клеток колоректальной карциномы HT-29 и ксенотрансплантатная модель колоректальной карциномы HCT-116).

В некоторых вариантах осуществления введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, описанного в данном документе, является эффективным для увеличения продолжительности выживаемости субъекта по сравнению с лечением с помощью длительно действующего агониста рецептора IL-15 и/или антитела отдельно. В других вариантах осуществления введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, описанного в данном документе, является эффективным для увеличения продолжительности выживаемости субъекта по сравнению с традиционным лечением. В одном или нескольких вариантах осуществления продолжительность выживаемости увеличивается на по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24 месяца или больше по сравнению с таковой у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием. В некоторых вариантах осуществления продолжительность выживаемости составляет по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 лет или больше.

В некоторых вариантах осуществления комбинированное лечение по настоящему изобретению является эффективным для увеличения выживаемости без прогрессирования (выживаемости без существенного прогрессирования заболевания, которое подвергают лечению) у субъекта. В вариантах осуществления выживаемость без прогрессирования увеличивается на по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24 месяца или больше по сравнению с таковой у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием. В некоторых вариантах осуществления выживаемость без прогрессирования составляет по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 лет или больше.

В некоторых вариантах осуществления комбинированное лечение по настоящему изобретению является эффективным для увеличения скорости ответа субъектов, получавших комбинацию. В вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения ответа у субъектов, получавших лечение, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием.

Комбинированная терапия также эффективна для стимулирования размножения NK-клеток у субъекта до заметно большей степени по сравнению с введением одного средства отдельно или по сравнению с субъектами, не получавшими лечения. В иллюстративной ксенотрансплантатной мышинной модели В-клеточной лимфомы Дауди, как описано в примере 2, введение длительно действующего агониста рецептора IL-15, в частности, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба приводило к значительному размножению NK-клеток в костном мозге мышей, получавших лечение. Как видно на фиг. 3, мыши, обработанные с помощью длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела к CD38 даратумумаба, продемонстрировали значительное увеличение пролиферации NK-клеток (количества клеток) в костном мозге по сравнению с мышами, не получавшими лечение, или мышами, получавшими любое одно из средств отдельно. Как видно на фиг. 4, мыши, получавшие длительно действующий агонист рецептора IL-15 и антитело к CD38 даратумумаб, имели значительно меньшее количество клеток В-клеточной лимфомы в костном мозге по сравнению с мышами, не получавшими лечение, или мышами, получавшими любое одно из средств отдельно. В примере 16 показано увеличение пролиферации NK-клеток в опухолевой ткани после введения иллюстративного длительно действующего агониста IL-15R (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба, на иллюстративной мышинной модели FaDu плоско-

клеточного рака головы и шеи человека.

В некоторых вариантах осуществления введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, описанного в данном документе, является эффективным для обеспечения увеличения размножения и пролиферации NK-клеток. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения пролиферации или размножения NK-клеток у субъектов, получавших лечение, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием. В вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения пролиферации или размножения NK-клеток у субъектов, получавших лечение, в по меньшей мере приблизительно 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз или больше по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием.

В некоторых вариантах осуществления введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, описанного в данном документе, является эффективным для увеличения истощения раковых клеток/уменьшения количеств раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения истощения раковых клеток у субъектов, получавших лечение, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием. В вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения истощения раковых клеток у субъектов, получавших лечение, в по меньшей мере приблизительно 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз или больше по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием.

В иллюстративной ксенотрансплантатной мышинной модели В-клеточной лимфомы Дауди, как описано в примере 2, введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15), и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба, приводило к значительному увеличению экспрессии гранзима В в NK-клетках костного мозга мышей, получавших лечение. Как видно на фиг. 6, у большинства мышей, получавших иллюстративный длительно действующий агонист рецептора IL-15 (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15) и антитело к CD38 даратумумаб, наблюдалось повышение экспрессии гранзима В в NK-клетках в костном мозге по сравнению с мышами, не получавшими лечение, или мышами, получавшими только одно антитело отдельно. Как далее видно на фиг. 6, комбинированное лечение обеспечивало активацию функцию большинства NK-клеток, о чем свидетельствует увеличение маркера гранзима В (цитотоксической протеазы). Как показано на фиг. 14 и описано в примере 11, введение иллюстративного длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба было эффективным для увеличения экспрессии гранзима В в NK-клетках в костном мозге из расчета на одну клетку по сравнению с мышами, не получавшими лечение, или получавшими только одно антитело отдельно. В иллюстративной мышинной модели плоскоклеточной карциномы головы и шеи FaDu человека, как описано в примере 16, введение иллюстративного длительно действующего агониста рецептора IL-15 (например, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела EGFR цетуксимаба было эффективным для увеличения экспрессии гранзима В в NK-клетках, присутствующих в образцах крови и опухоли, по сравнению с мышами, не получавшими лечение.

В некоторых вариантах осуществления введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и антитела, описанного в данном документе, является эффективным для обеспечения увеличения экспрессии гранзима В в NK-клетках. В одном или нескольких вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения экспрессии гранзима В в NK-клетках у субъектов, получавших лечение, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием. В вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению эффективна для увеличения экспрессии гранзима В в NK-клетках у субъектов, получавших лечение, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз или больше по сравнению с таковым у субъекта, получавшего только один из компонентов описанной в данном документе комбинации или традиционную терапию в связи с тем же показанием.

В иллюстративной мышинной модели, описанной в примере 10, введение иллюстративного длительно действующего агониста рецептора IL-15 (моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15) и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба было эффективным для увеличения фракции NK-клеток, экспрессирующих рецептор CD16 на клеточной поверхности, по сравнению с введением либо длительно действующего агониста рецептора IL-15, либо только антитела отдельно. В еще одной иллюстративной

мышинной модели колоректальной карциномы, описанной в примере 15, введение длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба было эффективным для увеличения экспрессии на поверхности клеток CD16 в крови и образцах опухолей по сравнению с мышами, не получавшими лечение. В некоторых вариантах осуществления длительно действующие агонисты IL-15R обеспечивают повышенную поверхностную экспрессию низкоаффинного рецептора Fc CD16 для обеспечения дополнительного иммунотерапевтического эффекта при использовании в комбинации с антителами, направленными к CD16 и имеющими механизм действия ADCC.

В третьем аспекте в данном документе представлен набор, содержащий антитело и длительно действующий агонист рецептора IL-15, как описано выше. Набор может дополнительно включать инструкции по использованию, а также необязательно любые медицинские принадлежности или устройства, необходимые для введения антитела и длительно действующего агониста рецептора IL-15.

Следует понимать, что хотя способы, комбинации, наборы и т.д. были описаны в связи с их предпочтительными конкретными вариантами осуществления, вышеприведенное описание, а также последующие примеры предназначены для иллюстрации, а не ограничения объема раскрытых способов, комбинаций, наборов и т.д. Другие аспекты, преимущества и модификации в рамках настоящего изобретения будут очевидны специалистам средней квалификации в соответствующей области техники.

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.

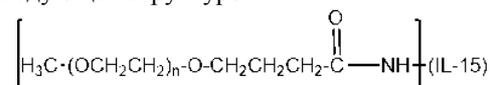
Примеры

Следует понимать, что вышеприведенное описание, а также приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема способов, комбинаций, наборов и т.п., представленных 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 используемых 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 C, и давление представляет собой атмосферное давление на уровне моря или примерно таковое. Считается, что каждый из следующих примеров является инструктивным для специалиста средней квалификации в данной области техники в отношении выполнения одного или нескольких вариантов осуществления, описанных в данном документе.

Материалы и способы

Иллюстративный длительно действующий агонист рецептора IL-15, используемый в следующих примерах, если не указано иное, представляет собой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15, как правило описываемый следующей структурой



где n имеет значение приблизительно 909 (так что полиэтиленгликолевая часть молекулы имеет средневесовую молекулярную массу приблизительно 40 килодальтон), также обозначается как [mPEG₄₀ кД-CH₂CH₂CH₂C(O)NH]-IL-15. Этот иллюстративный длительно действующий агонист рецептора IL-15 описан в данном документе как конъюгат 1 или соединение 1, поэтому эти термины используются взаимозаменяемо в следующих примерах. Получение моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 описано в примере 1 заявки РСТ № РСТ/US 2018/032817 (международная публикация № WO 2018/213341). Дозы и концентрации в этих примерах основаны на содержании белка IL-15.

Анализ SDS-PAGE

Образцы можно анализировать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с использованием системы электрофореза в геле Invitrogen (XCell SureLock Mini-Cell). Образцы перемешивали с образцом буфера, и полученные образцы загружали в предварительно изготовленный гель NuPAGE Novex и прогоняли в течение примерно тридцати минут.

Анализ RP-HPLC

Анализ обращенно-фазовой хроматографии (RP-HPLC) можно проводить на системе HPLC Agilent 1200 (Agilent). Образцы можно анализировать с использованием колонки Poroshell 300SB-C3 (2,1×75 мм, Agilent) при 60°C. Используемыми подвижными фазами могут быть 0,1% TFA/H₂O (A) и 0,1% TFA/CH₃CN (B). Скорость потока колонки может составлять 0,5 мл/мин. Элюированный белок и конъю-

гаты PEG-белок выявляют с использованием УФ-излучения 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 измеряли в соответствующей клеточной линии с использованием мультиплексного анализа фосфо-STAT5/суммарный STAT5 (Meso Scale Discovery, MD) в ответ на обработку образца и эталона в течение ~ 10 мин и как описано в заявке согласно PCT № PCT/US 2018/032817, которая включена в данный документ с помощью ссылки.

Анализ HuPBMС-pStat5

Эффективность IL-15 или длительно действующих агонистов рецептора IL-15 на различных клетках может быть определена с помощью анализа ответа от дозы с использованием фосфо-STAT5 (Y694), как описано далее в заявке согласно PCT № PCT/US 2018/032817.

Пример 1. Оценка выживаемости в ксенотрансплантатной модели В-клеточной лимфомы дауди после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к CD-20 ритуксимаба

В день 0 мышам SCID внутривенно вводили 1×10^7 клеток Дауди. Мышей делили на четыре группы. В дни 14 и 17 после инъекции клеток Дауди группы обрабатывали с помощью инъекции следующим образом. Группа 1: контрольное изотипическое антитело, группа 2: 40 мг/кг ритуксимаба IP, группа 3: 0,3 мг/кг моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15 (длительно действующий агонист рецептора IL-15), группа 4: 40 мг/кг ритуксимаба IP и 0,3 мг/кг SC моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (комбинация).

Выживаемость определяли путем измерения начала паралича задних конечностей как косвенного параметра. Результаты представлены на фиг. 2.

Как видно на фиг. 2, введение комбинации ритуксимаба и моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (обозначенного на фиг. 2 как "агонист рецептора IL-15") обеспечивало значительное увеличение длительной выживаемости по сравнению с введением любого из компонентов как единственного средства терапии (см. горизонтальную линию, обозначенную "комбинация"). Этот результат демонстрирует способность длительно действующего агониста рецептора mPEG-BA-IL-15 в случае введения в комбинации с иллюстративным моноклональным антителом к CD-20, таким как ритуксимаб, значительно увеличивать время выживаемости у мышей при оценке на модели лимфомы *in vivo*.

Пример 2. Оценка подсчитанных чисел клеток и экспрессии гранзима В в костном мозге в ксенотрансплантатной модели в-клеточной лимфомы дауди после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к CD38 даратумумаба

Мышам SCID (N=6/группа) внутривенно вводили 1×10^7 клеток Дауди в день 0 и подвергали обработке с помощью однократной дозы антитела к CD38 человека даратумумаба (0,5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и двух доз моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,3 мг/кг SC, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции). Мышей также обрабатывали с помощью видов терапии единственным средством: даратумумабом (0,5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) или двумя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (0,3 мг/кг SC, 14 и 21 дни после инокуляции).

Размножение и активацию NK-клеток и истощение лимфомы в костном мозге оценивали через три дня после второй дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (день 24) с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 3 и 4 соответственно. Как показано на фиг. 3, применение комбинации моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 и даратумумаба приводило к значительному увеличению количества NK-клеток в костном мозге обработанных мышей по сравнению с мышами, получавшими моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15 и даратумумаб как виды терапии единственным средством ($p=0,0026$ и $p < 0,0001$, соответственно) и по сравнению с необработанным контролем ($p < 0,0001$). (Односторонний дисперсионный анализ ANOVA, критерий множественного сравнения Тьюки). При комбинированной терапии наблюдали 19-кратное увеличение подсчитанного числа NK-клеток по сравнению с 10-кратным увеличением для монотерапии с помощью моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15, демонстрируя синергизм между иллюстративным моноклональным антителом и моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкином-15 внутри ткани костного мозга.

Как показано на фиг. 4, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 в комбинации с даратумумабом значительно улучшал истощение В-клеточной лимфомы по сравнению с таковым при обработках моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкином-15 и даратумумабом как единственными средствами ($p=0,02$ и $p=0,001$, соответственно) и по сравнению с необработанным контролем ($p < 0,0001$). (Односторонний дисперсионный анализ ANOVA, критерий множественного сравнения Тьюки).

Экспрессию гранзима В измеряли в NK-клетках костного мозга, как показано на фиг. 6. Как показа-

но, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 эффективен для контроля динамики НК-клеток даже в узкоспециализированных иммунных компартментах и эффективен отдельно или в комбинации с моноклональным антителом, таким как даратумумаб, для увеличения экспрессии гранзима В в костном мозге обработанных мышей. Таким образом, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 с антителом, связывающим опухоль, таким как даратумумаб, эффективна не только для значительного увеличения количеств НК-клеток в костном мозге, но также для активации функции уничтожения в большинстве случаев (> 70%) этих НК-клеток, как показано с помощью маркера гранзима В (цитотоксическая протеаза) на фиг. 6.

Эти результаты дополнительно иллюстрируют, что моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 эффективен для значительного усиления ADCC, опосредованного НК-клетками, в случае введения с противоопухолевым антителом.

Пример 3. Оценка выживаемости в ксенотрансплантатной модели В-клеточной лимфомы дауди после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба

Мышей SCID (N=8/группа), которым внутривенно инокулировали 1×10^7 клеток лимфомы В-клеток Дауди, обрабатывали однократной дозой даратумумаба (0,5 мг/кг, IP, 14 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (0,3 мг/кг, SC, вводимыми через 14, 21 и 28 дней после инокуляции опухоли). Также оценивали необработанных мышей в качестве контроля и мышей, получавших даратумумаб как единственное средство терапии. Выживаемость мышей, инокулированных опухолью, измеряли путем оценки состояния тела в качестве маркера конечной точки. Результаты представлены графическим образом на фиг. 5.

Как показано на фиг. 5, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 с даратумумабом значительно увеличивала среднюю выживаемость по сравнению с обработкой даратумумабом как единственным средством ($p < 0,05$, проверка по логранговому критерию). Средняя выживаемость для группы, получавшей комбинированную терапию, составляла 55 дней после инъекции опухоли, в то время как средняя выживаемость для группы обработки даратумумабом как единственным средством составляла 28,5 дней.

Пример 4. Активация НК-клеток и ингибиторная модуляция экспрессии поверхностных рецепторов клетки после обработки терапевтическими антителами, направленными против опухоли, и длительно действующим агонистом рецептора IL-15

Мышам Balb/c с опухолями В-клеточной лимфомы Дауди в костном мозге (n=6/группа) внутрибрюшинно вводили однократную дозу 0,5 мг/кг клинического антитела даратумумаба (DARZALEX®, Janssen Biotech), нацеленного на человеческий белок CD38, или неспецифического контрольного антитела с подходящим изотипом в день 14 после внутривенной инокуляции клеток Дауди. Дополнительным группам вводили подкожно моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15 (конъюгат 1) в дозе 0,3 мг/кг как единственное средство в дни 14 и 21 после инокуляции клеток Дауди или вводили комбинированное лечение с помощью конъюгата 1, вводимого подкожно, в дозах 0,03 мг/кг или 0,3 мг/кг в 14 и 21 дни после инокуляции клеток Дауди и даратумумаба, вводимого внутрибрюшинно, в дозе 0,5 мг/кг в день 14 после инокуляции клеток Дауди.

Через три дня после второго введения конъюгата 1 (день 24 после инокуляции Дауди) костный мозг собирали и измеряли фракцию НК-клеток с помощью проточной цитометрии в общем количестве клеток в костном мозге. Экспрессия рецептора активации клеточной поверхности NKG2D и рецептора ингибиторной контрольной точки NKG2A показана на фиг. 7А и 7В соответственно.

Результаты представлены в табл. 1 и на фиг. 7А-7В. Все группы, которые получали терапевтическую дозу конъюгата 1 как единственного средства или в комбинации с даратумумабом, продемонстрировали увеличенную фракцию НК-клеток, которые экспрессировали NKG2A на клеточной поверхности (фиг. 7А), и уменьшение фракции НК-клеток, которые экспрессировали NKG2D на клеточной поверхности (фиг. 7В) по сравнению со всеми видами обработки, за исключением конъюгата 1. Соответствующее увеличение активации рецептора ингибиторной контрольной точки и уменьшение активирующего рецептора, экспрессирующего НК-клетки, свидетельствовало об активации НК-клеток конъюгатом 1 в присутствии терапевтического антитела, нацеленного против опухоли, как это проиллюстрировано на даратумумабе в данном примере.

Таблица 1. Модуляция поверхностной экспрессии NKG2A и NKG2D с помощью конъюгата 1 и даратумумаба

Обработка мышей с В-клеточной лимфомой Дауди	% NK-клеток, экспрессирующих NKG2A (среднее, n=6)	% NK-клеток, экспрессирующих NKG2D (среднее, n=6)
Отсутствие обработки	59,08	9,480
Изотипическое контрольное антитело	57,13	10,04
Даратумумаб	54,83	10,22
Конъюгат 1 0,3 мг/кг	73,70	2,157
Конъюгат 1 0,3 мг/кг и даратумумаб	69,47	2,138
Конъюгат 1 0,03 мг/кг и даратумумаб	58,60	6,890

Пример 5. Индукция пролиферации NK-клеток человека после обработки с помощью длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иммуноглобулина

Пролиферацию NK-клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека, меченых препаратом CFSE, индуцировали *in vitro*. PBMC, меченые CFSE, инкубировали в течение 5 дней *in vitro* в присутствии (i) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ κД-интерлейкина-15 (конъюгат 1) в концентрации 100 нг/мл; (ii) на пластике для клеточных культур, который был предварительно покрыт в течение ночи раствором общего иммуноглобулина G человека (hIgG) в концентрации 0,1 мг/мл (iii) на пластике для клеточных культур, который был предварительно покрыт в течение ночи раствором общего иммуноглобулина G человека (hIgG) в концентрации 0,1 мг/мл и в присутствии конъюгата 1 в концентрации 100 нг/мл; или (iv) на обычном пластике для клеточных культур. После периода инкубации пролиферацию клеток, на что указывало снижение CFSE в клетках, подвергшихся удвоению клеток, измеряли с помощью проточной цитометрии (фиг. 8A-8D) с измерением уровней CFSE в CD56⁺ человеческих NK-клетках в препарате PBMC в каждом из четырех условий инкубации.

Результаты представлены в табл. 2 и на фиг. 8A-8D. Данные продемонстрировали, что в случае если ни конъюгат 1, ни hIgG не воздействовали на PBMC, пролиферировали только 2,25% NK-клеток. 3,92% NK-клеток пролиферировали в присутствии только hIgG. Воздействие конъюгата 1 приводило к пролиферации 49,7% NK-клеток. Однако в случае если PBMC подвергались воздействию как hIgG, так и конъюгата 1, 72% NK-клеток пролиферировали, что указывало на то, что обработка с помощью комбинации hIgG и конъюгата 1 вызывала пролиферацию значительно большего количества клеток, чем сумма результатов обработок с помощью hIgG и конъюгата 1 как единственных средств.

Таблица 2. Пролиферация человеческих NK-клеток в присутствии конъюгата 1 и hIgG *in vitro*

Обработка PBMC	% пролиферирующих CD56 ⁺ NK-клеток
Отсутствие конъюгата 1, отсутствие hIgG	2,25%
hIgG	3,92%
Конъюгат 1	49,7%
hIgG и конъюгат 1	72%

Пример 6. Функциональная активация NK-клеток человека после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иммуноглобулина

Функциональную активацию человеческих NK-клеток в препарате мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека индуцировали *in vitro*. PBMC от двух доноров инкубировали в течение ночи в присутствии (i) моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ κД-интерлейкина-15 (конъюгат 1) в концентрации 1 мкг/мл; (ii) на пластике для клеточных культур, который был предварительно покрыт в течение ночи раствором общего иммуноглобулина G человека (hIgG) в концентрации 0,1 мг/мл; (iii) на пластике для клеточных культур, который был предварительно покрыт в течение ночи раствором общего иммуноглобулина G человека (hIgG) в концентрации 0,1 мг/мл и в присутствии конъюгата 1 в концентрации 1 мкг/мл; или (iv) на обычном пластике для клеточных культур.

После периода инкубации активацию NK-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии путем измерения увеличения сигнала средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD69 (фиг. 9A) и CD107a (фиг. 9B) с выявлением антител на поверхности CD56⁺ NK-клеток человека в пределах PBMC. Функциональную активацию NK-клеток оценивали путем вычисления кратного изменения MFI при сравнении контрольных условий, в случае если клетки не подвергались воздействию ни hIgG, ни конъю-

гата 1. Увеличение кратности изменения маркеров активации MFI указывало на увеличение этих маркерных белков на отдельных NK-клетках, что указывало на функциональную активацию NK-клеток. Концентрацию секретированного гранзима В, также указывающую на активацию NK-клеток в культуральной среде в конце эксперимента, измеряли с помощью ELISA (фиг. 9С).

Результаты представлены в табл. 3 и на фиг. 9А-9С. Данные продемонстрировали, что CD69 MFI на NK-клетках увеличивался в 1,4 раза в присутствии hIgG. Воздействие конъюгата 1 приводило к увеличению MFI CD69 в 1,8 раза. Однако в случае если PBMC подвергались воздействию как hIgG, так и конъюгата 1, MFI CD69 увеличивался в 3,2 раза на NK-клетках, больше, чем при каждой обработке в отдельности. CD107a MFI на NK-клетках увеличивался в 1,8 раза в присутствии hIgG. Воздействие конъюгата 1 приводило к увеличению MFI CD107a в 2,6 раза. Однако в случае если PBMC подвергались воздействию как hIgG, так и конъюгата 1, MFI CD107a увеличивался в 4,3 раза на NK-клетках больше, чем при каждой обработке в отдельности. Концентрация секретированного гранзима В не увеличивалась в присутствии hIgG по сравнению с контрольными условиями. Воздействие конъюгата 1 приводило к увеличению концентрации гранзима В в культуральной среде в 4,1 раза. Однако в случае если PBMC подвергались воздействию как hIgG, так и конъюгата 1, концентрация гранзима В увеличивалась в 18,7 раза в культуральной среде, что значительно больше, чем при каждой обработке в отдельности.

Таблица 3. Активация NK-клеток человека в присутствии конъюгата 1 и hIgG *in vitro*

Обработка PBMC	CD56+ NK-клетки среднее (n=2) CD69 MFI и кратное изменение относительно контроля без стимуляции	CD56+ NK-клетки среднее (n=2) CD107a MFI и кратное изменение относительно контроля без стимуляции	Концентрация гранзима В в пг/мл и кратное изменение относительно контроля без стимуляции
Отсутствие конъюгата 1, отсутствие hIgG	4197, н/д	601,5, н/д	13,5, н/д
hIgG	5731, 1,4	1104, 1,8	11, 0,8
Конъюгат 1	7749, 1,8	1553, 2,6	56, 4,1
hIgG и конъюгат 1	13232, 3,2	2594, 4,3	252,6, 18,7

Пример 7. Передача сигналов *in vitro* длительно действующего агониста рецептора IL-15 и эффект в отношении пролиферации

Клетки KHYG-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% FBS, 2 mM L-глутамина и 20 нг/мл IL-2 (полная среда для роста) в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

За день до обработки исследуемыми соединениями клетки высевали с плотностью 500000 жизнеспособных клеток/мл в полную среду для выращивания и инкубировали в течение ночи при нормальных условиях роста. В день проведения анализа клетки KHYG-1 промывали 3 раза с помощью DPBS, ресуспендировали в среде для анализа (среда RPMI-1640 с добавлением 20% FBS, 2 mM L-глутамина) и инкубировали в течение 4-5 ч при 37°C, 5% CO₂. Клетки доводили до соответствующей плотности (8×10⁵ клеток/мл) в среде для анализа и 50000 клеток/лунку помещали аликвотами в лунки 96-луночного планшета (View-Plate 96, Perkin-Elmer).

Оценка фосфорилирования STAT5

Клетки KHYG-1 стимулировали с помощью IL-15 или длительно действующим агонистом рецептора IL-15 (моно(mPEG-бутанамид)IL-15) с последующей инкубацией при 37°C, 5% CO₂ в течение 10 мин. Обработанные клетки лизировали на льду.

Определение уровней белка фосфо-STAT5 в клеточных лизатах выполняли с использованием набора Phospho(Tyr694)/Total STAT5a, b Assay Whole Cell Lysate (продукт MSD № K15163D). Сигнал относительной световой единицы (RLU), соответствующий люминофору-STAT5, получали с использованием планшет-ридера Sector® Imager 2400 (MSD) с результатами, представленными на фиг. 10А. Как IL-15, так и длительно действующий агонист рецептора IL-15 продуцировали дозозависимое фосфорилирование STAT5 в линии NK-клеток человека KHYG-1, что свидетельствовало о том, что соединения эффективны в передаче сигналов *in vitro*. Длительно действующий агонист рецептора IL-15 индуцировал фосфорилирование STAT5 с получением максимального процента фосфорилирования STAT5, который был аналогичен IL-15, хотя и с ~3-кратно меньшей эффективностью. Эти данные предполагают, что длительно действующий агонист рецептора IL-15 может эффективно задействовать и активировать нижестоящую передачу сигналов в клеточной линии KHYG-1.

Оценка пролиферации клеток

Стимуляцию клеток КНУГ-1 инициировали переносом IL-15 или длительно действующего агониста рецептора IL-15 (моно(mPEG-бутанамид)IL-15) в дублирующие лунки, содержащие клетки, с последующей 48-часовой инкубацией при 37°C, 5% CO₂.

Рост клеток в каждой лунке измеряли путем отслеживания уровней АТФ с помощью CellTiter-Glo 2.0, следуя инструкциям производителя. Эффект длительно действующего агониста рецептора IL-15 в отношении пролиферации клеток КНУГ-1 сравнивали с действием IL-15 после 48-часовой обработки с использованием CellTiter-Glo 2.0 с результатами, показанными на фиг. 10В. Как видно на фигуре, максимальный пролиферативный ответ на длительно действующий агонист рецептора IL-15 был сопоставим с ответом, вызываемым IL-15.

Пример 8. Индукция пролиферации *in vitro* NK-клеток человека после обработки с помощью длительно действующего агониста рецептора IL-15

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), меченые препаратом CFSE, инкубировали в течение 5 дней *in vitro* в присутствии возрастающих доз rhIL-15 (диапазон доз от 1 нг/мл до 100 нг/мл, 5-точечные, 3-кратные разбавления) или длительно действующего агониста рецептора IL-15 (моно(mPEG-бутанамид) L-15) (диапазон доз от 10 нг/мл до 1000 нг/мл, 5-точечные, 3-кратные разбавления). После периода инкубации пролиферацию клеток, на что указывало снижение CFSE в клетках, подвергшихся удвоению клеток, измеряли с помощью проточной цитометрии, измеряя уровни CFSE в CD56+ NK-клетках человека в препарате PBMC. Результаты представлены на фиг. 11 и в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Пролиферация PBMC человека *in vitro*

Обработка PBMC	EC50 (нг/мл)-% пролиферации	E _{max} -% пролиферации
rhIL-15	2,28	69,6%
длительно действующий агонист рецептора IL-15 α	39,04	71,6%

Как rhIL-15, так и длительно действующий агонист рецептора IL-15 зависимым от дозы образом индуцировали пролиферацию NK-клеток человека. Длительно действующий агонист рецептора IL-15 в примерно 17 раз менее эффективен, чем rhIL-15, в индуцировании пролиферации NK-клеток человека. Однако максимальный ответ пролиферации, продуцируемый rhIL-15 и длительно действующим агонистом рецептора IL-15, сопоставим.

Пример 9. Оценка цитотоксичности NK-клеток после обработки длительно действующим агонистом рецептора IL-15 и иммуноглобулином

NK-клетки человека отсортировывали магнитным способом от нормальных донорских PBMC с использованием отрицательной селекции. NK-клетки высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при плотности 400000 клеток/лунка. NK-клетки стимулировали с помощью 1000 нг/мл длительно действующего агониста рецептора IL-15 (моно(mPEG-бутанамид)IL-15) (+) или оставляли нестимулированными (-) в полной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотика/антимикотика в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

Клетки множественной миеломы человека RPMI-8226 (ATCC № CCL-155) промывали в PBS и окрасивали 0,15 мкМ CFSE в течение 5 мин при 37°C. Опухолевые клетки предварительно покрывали 100 нг/мл даратумумаба (+) в течение 1 ч при 37°C, где это указано. Стимулированные NK-клетки (эффекторные клетки) и предварительно покрытые CFSE-меченые опухолевые клетки (целевые клетки) совместно культивировали при соотношении Е:Т 10:1 в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки промывали проточным буфером для окрашивания, блокировали Fc в течение 15 мин при 4°C и окрашивали поверхность (CD45, CD56, антитела, флуоресцентно конъюгированные с CD3). Клетки промывали в PBS и инкубировали при окрашивании на жизнеспособность 7-аминоактиномицином (7-AAD) в течение 30 мин при 4°C перед сбором для проточного цитометрического анализа с использованием Fortessa (BD). Процент целевых клеток 7-AAD+ CFSE+ от общей популяции клеток представлял собой процент мертвых опухолевых клеток.

Результаты представлены на фиг. 12. Данные продемонстрировали, что NK-клетки человека, примированные длительно действующим агонистом рецептора IL-15, усиливали ADCC клеток множественной миеломы, предварительно покрытых даратумумабом. NK-клетки, примированные длительно действующим агонистом рецептора IL-15, были более цитотоксичными для целевых клеток, чем необработанные NK-клетки или NK-клетки, обработанные даратумумабом отдельно.

Пример 10. Модуляция экспрессии на поверхности клетки низкоаффинного рецептора (CD16) иммуноглобулина после обработки терапевтическими антителами, направленными против опухоли, и длительно действующим агонистом рецептора IL-15

Мышам Balb/c с опухолями В-клеточной лимфомы Дауди в костном мозге (n=6/группа) внутри-

брюшинно вводили однократную дозу 0,5 мг/кг клинического антитела даратумумаба (DARZALEX®, Janssen Biotech), нацеленного на человеческий белок CD38, или неспецифического контрольного антитела с подходящим изотипом в день 14 после внутривенной инокуляции клеток Дауди. Дополнительные группы обрабатывали (i) моно(mPEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкином-15 (конъюгат 1), вводимым подкожно при 0,3 мг/кг как единственное средство в дни 14 и 21 после инокуляции клеток Дауди, или (ii) проводили обработку комбинацией конъюгата 1, вводимого подкожно в дозах 0,03 мг/кг или 0,3 мг/кг в дни 14 и 21 после инокуляции клеток Дауди, и даратумумаба, вводимого внутривенно при 0,5 мг/кг в день 14 после инокуляции клеток Дауди.

Через три дня после второго введения конъюгата 1 (день 24 после инокуляции Дауди) костный мозг собирали и измеряли фракцию NK-клеток с помощью проточной цитометрии в общем количестве клеток в костном мозге. Фракция NK-клеток, экспрессирующих рецептор CD16 на клеточной поверхности, который, как известно, опосредует антителозависимый механизм клеточной цитотоксичности в присутствии нацеленных на опухоль антител, и изменение экспрессии CD16 из расчета на клетку на NK-клетках показаны на фиг. 13А и 13В соответственно.

Результаты представлены в табл. 5 и 6 и на фиг. 13А-13В. Все группы, которые получали терапевтическую дозу конъюгата 1 как единственного средства или в комбинации с даратумумабом, продемонстрировали повышенную фракцию NK-клеток, которые экспрессировали CD16 на клеточной поверхности (фиг. 13А), а также увеличивалась экспрессия CD16 на NK-клетках из расчета на клетку (фиг. 13В) по сравнению со всеми видами обработки, за исключением конъюгата 1. Соответствующее увеличение количества NK-клеток, экспрессирующих рецептор CD16, а также увеличение экспрессии CD16 на отдельных NK-клетках, свидетельствовало об активации NK-клеток конъюгатом 1 в присутствии терапевтического антитела, нацеленного на опухоль, как это проиллюстрировано в данном примере в случае даратумумаба.

Таблица 5. Фракция NK-клеток, экспрессирующих CD16 на клеточной поверхности

Обработка	Фракция NK-клеток, экспрессирующих CD16 на клеточной поверхности (среднее значение)
Необработанные	83%
Изотипическое контрольное антитело	81%
Конъюгат 1, 0,3 мг/кг	96%
Даратумумаб, 0,5 мг/кг	81%
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,3 мг/кг	97%
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,03 мг/кг	91%

Таблица 6. Экспрессия CD16 из расчета на клетку на NK-клетках

Обработка	Средняя интенсивность флуоресценции CD16 (среднее значение MFI)	Относительная экспрессия CD16 по сравнению с условием без обработки
Необработанные	477	Н/д
Изотипическое контрольное антитело	425	Отсутствие повышения (0,9x)
Конъюгат 1, 0,3 мг/кг	853	1,8x повышение
Даратумумаб, 0,5 мг/кг	448	Отсутствие повышения (1x)
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,3 мг/кг	954	2x повышение
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,03 мг/кг	663	1,4x повышение

Пример 11. Модуляция экспрессии цитотоксического белка гранзима В NK-клеток после обработки терапевтическими антителами, направленными против опухоли, и длительно действующим агонистом рецептора IL-15

Мышам Balb/c с опухолями В-клеточной лимфомы Дауди в костном мозге (n=6/группа) внутривенно вводили однократную дозу 0,5 мг/кг клинического антитела даратумумаба (DARZALEX®, Janssen Biotech), нацеленного на человеческий белок CD38, или неспецифического контрольного антитела с подходящим изотипом в день 14 после внутривенной инокуляции клеток Дауди. Дополнительные группы обрабатывали (i) моно(mPEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкином-15 (конъюгат 1), вводимым под-

кожно при 0,3 мг/кг как единственное средство в дни 14 и 21 после инокуляции клеток Дауди, или (ii) проводили обработку комбинацией конъюгата 1, вводимого подкожно в дозах 0,03 мг/кг или 0,3 мг/кг в дни 14 и 21 после инокуляции клеток Дауди, и даратумумаба, вводимого внутривенно при 0,5 мг/кг в день 14 после инокуляции клеток Дауди.

Через три дня после второго введения конъюгата 1 (день 24 после инокуляции Дауди) костный мозг собирали и измеряли фракцию NK-клеток с помощью проточной цитометрии в общем количестве клеток в костном мозге. Изменение внутриклеточной экспрессии гранзима В из расчета на клетку на NK-клетках показано на фиг. 14.

Результаты представлены в табл. 7 и на фиг. 14. Группы, которые получали терапевтическую дозу конъюгата 1 как единственное средство или в комбинации с даратумумабом, продемонстрировали повышенную экспрессию гранзима В из расчета на клетку в NK-клетках (фиг. 14) по сравнению со всеми видами обработки, за исключением конъюгата 1. Соответствующее увеличение экспрессии гранзима В в отдельных NK-клетках указывало на активацию NK-клеток конъюгатом 1 в присутствии терапевтического антитела, нацеленного на опухоль, примером чего в данном примере является даратумумаб.

Таблица 7. Экспрессия гранзима В из расчета на клетку в NK-клетках

Обработка	Средняя интенсивность флуоресценции гранзима В (среднее значение MFI)	Относительная экспрессия гранзима В по сравнению с условием без обработки
Необработанные	396	Н/д
Изотипическое контрольное антитело	312	Отсутствие повышения (0,8x)
Конъюгат 1, 0,3 мг/кг	2649	6,7x повышение
Даратумумаб, 0,5 мг/кг	272	Отсутствие повышения (0,7x)
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,3 мг/кг	2056	5,2x повышение
Даратумумаб+конъюгат 1, 0,03 мг/кг	431	Отсутствие повышения (1x)

Пример 12. Оценка антителоопосредованной антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) на клетках в-клеточной лимфомы *in vitro* после обработки длительно действующим агонистом рецептора IL-15

NK-клетки человека отсортировывали магнитным способом от нормальных донорских PBMC с использованием отрицательной селекции. NK-клетки высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при плотности 80000 клеток/луночка (фиг. 15A) или 400000 клеток/луночка (фиг. 15B). NK-клетки стимулировали с помощью 300 нг/мл длительно действующего агониста рецептора IL-15 (моно(mPEG-бутанамид)IL-15) (+) или оставляли нестимулированными (-) в полной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотика/антимикотика в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

Клетки множественной миеломы человека RPMI-8226 (ATCC № CCL-155) промывали в PBS и окрашивали 0,15 мкМ CFSE в течение 5 мин при 37°C. Стимулированные NK-клетки (эффektorные клетки) и покрытые даратумумабом (+ 1 мкг/мл) опухолевые клетки, меченые CFSE (целевые клетки), одновременно культивировали совместно в соотношении E:T 10:1 в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки промывали проточным буфером для окрашивания, блокировали Fc в течение 15 мин при 4°C и окрашивали поверхность (CD45, CD56, антитела, флуоресцентно конъюгированные с CD3). Клетки промывали в PBS и инкубировали при окрашивании на жизнеспособность 7-аминоактиномицином (7-AAD) в течение 30 мин при 4°C перед сбором для проточного цитометрического анализа с использованием Fortessa (BD). Процент целевых клеток 7-AAD+ CFSE+ от общей популяции клеток представлял собой процент мертвых опухолевых клеток. Результаты представлены на фиг. 15A.

В качестве альтернативы клетки В-клеточной лимфомы человека (Дауди) промывали в PBS и окрашивали 0,3 мкМ CFSE в течение 5 мин при 37°C. Покрытые ритуксимабом (+ 10 нг/мл) опухолевые клетки (целевые клетки), меченые CFSE, одновременно культивировали совместно с NK-клетками (эффektorными клетками) в соотношении E:T 2:1 в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки промывали проточным буфером для окрашивания, блокировали Fc в течение 15 мин при 4°C и окрашивали поверхность (CD45, CD56, антитела, флуоресцентно конъюгированные с CD3). Клетки промывали в PBS и инкубировали при окрашивании на жизнеспособность 7-аминоактиномицином (7-AAD) в течение 30 мин при 4°C перед сбором для проточного цитометрического анализа с использованием Fortessa (BD).

Процент целевых клеток 7-AAD+ CFSE+ от общей популяции клеток представлял собой процент мертвых опухолевых клеток. Результаты представлены на фиг. 15B.

Данные продемонстрировали, что NK-клетки человека, примированные длительно действующим агонистом рецептора IL-15, усиливали ADCC клеток В-клеточной лимфомы, покрытых даратумумабом и покрытых ритуксимабом. NK-клетки, примированные длительно действующим агонистом рецептора IL-15, являются более цитотоксичными для целевых клеток, чем необработанные NK-клетки.

Пример 13. Оценка выживаемости в ксенотрансплантатных моделях в-клеточной лимфомы дауди после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба

Мышей SCID или SCID beige (N=8/группа), которым внутривенно инокулировали 10 миллионов клеток лимфомы В-клеток Дауди, обрабатывали однократной дозой даратумумаба (0,5 мг/кг, IP, 14 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно, вводимого через 14, 21 и 28 дней после инокуляции опухоли). Также оценивали необработанных мышей SCID/beige или CB17 SCID в качестве контроля. Выживаемость мышей с инокулированной опухолью измеряли с помощью оценки состояния тела и начала паралича задних конечностей в качестве маркеров конечной точки. Результаты представлены графическим образом на фиг. 16.

Как показано на фиг. 16, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 и даратумумаба приводила к более чем двукратному увеличению выживаемости (33 дня) по сравнению со средней выживаемостью 27 дней у необработанных контрольных мышей SCID до 60 дней в случае обработанных комбинацией мышей. Напротив, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 с обработкой даратумумабом у мышей SCID, несущих мутацию бежевого цвета, которая снижала функциональность NK-клеток (SCID beige), приводила только к увеличению выживаемости на 7 дней (от 23 дней у необработанных мышей SCID beige до 30 дней в случае получавших комбинацию мышей SCID beige). Эти результаты показывают, что активность NK-клеток требуется для полного терапевтического эффекта комбинации моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 с обработкой даратумумабом.

Пример 14. Оценка подсчитанных чисел клеток в ксенотрансплантатной модели в-клеточной лимфомы дауди после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела к CD38 даратумумаба

Мышам SCID (N=6/группа) внутривенно вводили 10 миллионов клеток Дауди в день 0 и подвергали обработке с помощью однократной низкой и высокой доз даратумумаба (0,05 мг/кг или 5 мг/кг IP, через 14 дней после инокуляции клеток Дауди) и двух доз либо низкой, либо высокой дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) (0,03 мг/кг или 0,6 мг/кг внутривенно, по одной дозе в каждый из 14 и 21 дней после инокуляции). Мышей также обрабатывали с помощью видов терапии единственным средством: даратумумабом (0,05 мг/кг или 5 мг/кг IP, 14 дней после инокуляции клеток Дауди) или двумя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,03 мг/кг или 0,6 мг/кг внутривенно, 14 и 21 дни после инокуляции). Количество клеток Дауди в костном мозге оценивали через три дня после второй дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15 (день 24) с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 17A и 17B.

Как показано на фиг. 17A-17B, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) с даратумумабом истощала опухолевые клетки внутри костного мозга с сопоставимой эффективностью, в случае если высокий уровень дозы даратумумаба (5 мг/кг) комбинировали с низкой дозой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,03 мг/кг) (фиг. 17A), при этом истощалось 96% опухолевых клеток по сравнению с тем, когда даратумумаб в низкой дозе (0,05 мг/кг) сочетали с высокой дозой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (0,6 мг/кг) (фиг. 17B), при этом истощалось 92% опухолевых клеток. Как единственные средства обработки низкие дозы даратумумаба и моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 истощали только 30 и 42% опухолевых клеток соответственно. Как единственные средства обработки высокие дозы даратумумаба и моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 истощали только 58 и 69% опухолевых клеток соответственно. Эти результаты показывают, что снижение уровня дозы или концентрации в тканях в лечении даратумумабом может быть компенсировано увеличением уровня дозы моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 или концентрации в тканях для поддержания высокой эффективности уничтожения опухолевых клеток с помощью обработки комбинацией.

Пример 15. Оценка клеточной модели колоректальной карциномы HCT-116 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

Клетки HCT-116 культивировали в RPMI1640 с 5% FBS в течение двух недель перед инокуляцией. Мышам Balb/c SCID (N=4/группа) подкожно инокулировали 5 млн клеток HCT-116. Через 7 дней после инокуляции опухолевых клеток при среднем объеме опухоли ~ 150 мм³ (день 0) мышей обрабатывали однократной дозой антитела к EGFR человека, цетуксимабом (20 мг/кг IP) и однократной дозой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг IV).

Через три и пять дней после обработки кровь и опухолевую ткань собирали и фракцию NK-клеток

измеряли с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 18А. Как видно на фиг. 18А, обработка обеспечивала индукцию увеличения фракции NK-клеток в общем количестве живых клеток в опухолях. Через три и пять дней после обработки кровь и опухолевую ткань собирали и измеряли количества NK-клеток с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 18В. Как показано на фиг. 18В, обработка обеспечивала увеличение количеств NK-клеток в опухолевой ткани.

Образцы подвергали иммунофенотипированию в отношении % Ki-67 с помощью проточной цитометрии (см. фиг. 18С) в день 3 после обработки. На фиг. 18С представлен график пролиферации NK-клеток, измеренной по % положительности Ki-67, используемой в качестве маркера пролиферирующих клеток, с течением времени. *Индукция маркера Ki67 наблюдалась в большинстве NK-клеток, что указывало на эффективный пролиферативный ответ после обработки.

Экспрессию гранзима В измеряли в крови или опухолевых NK-клетках в день 3 с помощью проточной цитометрии после обработки, как показано на фиг. 18D. Как проиллюстрировано в данном документе, увеличение экспрессии GzmB наблюдалось как в крови, так и в опухолевых NK-клетках после обработки, что указывало на цитотоксическую активацию NK-клеток в результате обработки.

Фракцию NK-клеток крови или опухоли, экспрессирующих рецептор CD16 клеточной поверхности, измеряли с помощью проточной цитометрии путем измерения увеличения сигнала средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD16, как показано на фиг. 18Е. Как проиллюстрировано в данном документе, увеличение экспрессии CD16 на клеточной поверхности было вызвано обработкой, что указывало на активацию NK-клеток.

Через три дня после обработки кровь и опухолевые клетки собирали и измеряли экспрессию рецептора NKG2D клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии с результатами, показанными на фиг. 18F. Как показано, поверхностная экспрессия NKG2D снижалась в соответствии с функциональной активацией NK-клеток с помощью обработки.

Эти результаты дополнительно дали возможность предположить, что моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 эффективен для существенного усиления ADCC, опосредованного NK-клетками, в случае введения с противоопухолевым антителом.

Пример 16. Оценка на модели плоскоклеточной карциномы головы и шеи FaDu человека после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

Мышам Balb/c SCID (N=4/группа) внутривенно инокулировали 3 миллиона клеток FaDu. Через 7 дней после инокуляции опухолевых клеток при среднем объеме опухоли ~150 мм³ (день 0) мышей обрабатывали однократной дозой антитела к EGFR человека, цетуксимабом (20 мг/кг IP) и однократной дозой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг IV) ~150 мм³.

Через три и пять дней после обработки кровь и опухолевую ткань собирали и измеряли фракцию NK-клеток с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 19А. Как видно на фиг. 19А, обработка обеспечивала индукцию увеличения фракции NK-клеток в общем количестве живых клеток в опухолях. Через три и пять дней после обработки кровь и опухолевую ткань собирали и измеряли количества NK-клеток с помощью проточной цитометрии, как показано на фиг. 19В. Как показано на фиг. 19В, обработка обеспечивала увеличение количеств NK-клеток в опухолевой ткани.

Образцы подвергали иммунофенотипированию в отношении % Ki-67 (см. фиг. 19С) в день 3 после обработки. На фиг. 19С представлен график пролиферации NK-клеток, измеренной по % положительности Ki-67, используемой в качестве маркера пролиферирующих клеток, с течением времени. Индукция маркера Ki67 наблюдалась в большинстве NK-клеток, что указывало на эффективный пролиферативный ответ после обработки.

Экспрессию гранзима В измеряли в крови или опухолевых NK-клетках в день 3 с помощью проточной цитометрии после обработки, как показано на фиг. 19D. Как проиллюстрировано в данном документе, увеличение экспрессии GzmB наблюдалось как в крови, так и в опухолевых NK-клетках после обработки, что указывало на цитотоксическую активацию NK-клеток в результате обработки.

Фракцию NK-клеток крови или опухоли, экспрессирующих рецептор CD16 клеточной поверхности, измеряли с помощью проточной цитометрии путем измерения увеличения сигнала средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD16, как показано на фиг. 19Е. Как проиллюстрировано в данном документе, увеличение экспрессии CD16 на клеточной поверхности было вызвано обработкой, что указывало на активацию NK-клеток.

Через три дня после обработки кровь и опухолевые клетки собирали и измеряли экспрессию рецептора NKG2D клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии с результатами, показанными на фиг. 19F. Как показано, поверхностная экспрессия NKG2D снижалась в соответствии с функциональной активацией NK-клеток с помощью обработки.

Эти результаты дополнительно дали возможность предположить, что моно(метокси-PEG-N-бутанамид)интерлейкин-15 эффективен для существенного усиления ADCC, опосредованного NK-клетками, в случае введения с противоопухолевым антителом.

Пример 17. Оценка ингибирования роста опухоли на модели опухоли легкого H1975 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

Бестимусных мышей Balb/c (N=10/группа), которым подкожно в бок инокулировали 5 миллионов клеток H1975, обрабатывали 3 дозами цетуксимаба (0,25 мг/кг, IP, через 9, 12 и 16 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ кД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно), вводимыми через 9, 16 и 23 дня после инокуляции опухоли. Контроль задержки роста опухоли выполняли в день 27 после начала лечения. Результаты представлены графическим образом на фиг. 20.

Как показано на фиг. 20, обработка моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкином-15 не приводила к ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. У мышей, получавших цетуксимаб, рост опухоли возобновился после завершения схемы обработки цетуксимабом. Напротив, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с обработкой цетуксимабом приводила к задержке рецидива роста опухоли в день 27 после начала лечения с проявлением значительно более медленного роста опухоли ($p=0,02$, тест Манна-Уитни) при обработке с помощью комбинации моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с цетуксимабом по сравнению с обработкой цетуксимабом как единственным средством. Эти данные указывают на то, что комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с цетуксимабом приводила к лучшему контролю роста опухоли по сравнению с обработкой цетуксимабом как единственным средством в этой модели опухоли.

Пример 18. Оценка ингибирования и задержки развития опухоли на клеточной модели колоректальной карциномы HT-29 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

Мышей SCID (N=8/группа), которым подкожно в бок инокулировали 5 млн клеток HT-29, обрабатывали всего шестью дозами цетуксимаба (40 мг/кг, IP, через 7, 11, 14, 18, 21, 25 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ кД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно), вводимыми через 7, 14 и 21 день после инокуляции опухоли. Ингибирование роста опухоли оценивали в день 21 после начала лечения. Результаты представлены графически на фиг. 21А.

Как показано на фиг. 21А, обработки моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкин-15 или цетуксимаба как единственными средствами не приводили к ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. Напротив, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с обработкой цетуксимабом приводила к существенному ингибированию роста опухоли. Эти данные продемонстрировали, что комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 и цетуксимаба приводила к ингибированию роста опухоли в модели опухоли, устойчивой к цетуксимабу.

Задержку роста опухоли (TVQT) оценивали с учетом конечной точки, установленной как 400% роста опухоли от исходного уровня. На фиг. 21В показано, что 38% задержка роста опухоли была определена с помощью измерения времени увеличения объема опухоли в четыре раза (TVQT) от исходного объема опухоли в день начала обработки.

Пример 19. Оценка ингибирования и задержки развития опухоли в ксенотрансплантатной модели колоректальной карциномы HT-116 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

Мышей SCID (N=8/группа), которым подкожно в бок инокулировали 5 миллионов клеток НСТ-116, обрабатывали всего шестью дозами цетуксимаба (40 мг/кг, IP, через 7, 11, 14, 18, 21, 25 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ кД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно, вводимыми через 7, 14 и 21 дни после инокуляции опухоли). Ингибирование роста опухоли оценивали в день 19 после начала лечения. Результаты представлены графически на фиг. 22А.

Как показано на фиг. 22А, обработка цетуксимабом как единственным средством не приводила к ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. Обработка моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкином-15 как единственным средством приводила к 31% ингибированию роста опухоли. Напротив, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с обработкой цетуксимабом приводила к 42% ингибированию роста опухоли. Эти данные продемонстрировали, что комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 и цетуксимаба приводила к ингибированию роста опухоли в модели опухоли, устойчивой к цетуксимабу.

Задержку роста опухоли оценивали с помощью измерения времени увеличения объема опухоли в четыре раза (TVQT) от исходного объема опухоли в день начала обработки. На фиг. 22В показано, что при обработке с помощью комбинации индуцировали 42% задержки роста опухоли, а с помощью обработки моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ кД-интерлейкином-15 (соединение 1) как единственным средством индуцировали 26% задержки роста опухоли, в то время как обработка цетуксимабом как единственным средством не приводила к задержке роста опухоли.

Пример 20. Оценка антителоопосредованной клеточной цитотоксичности (ADCC) на *in vitro* модели колоректальной карциномы HCT-116 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к EGFR цетуксимаба

НК-клетки человека отсортировывали магнитным способом от нормальных донорских PBMC с использованием отрицательной селекции. НК-клетки высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при плотности 400000 клеток/луночка. НК-клетки стимулировали с помощью моно(метокси-PEG-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкина-15 (соединение 1) (300 нг/мл) (+) или оставляли нестимулированными (-) в полной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотика/антимикотика в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

Клетки HCT-116 толстой кишки (ATCC № CCL-247) культивировали в среде McCoy 5A (ATCC+ 30-2007) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотика/антимикотика при 37°C в 5% CO₂. Клетки HCT-116 субкультивировали путем инкубирования в 0,25% трипсин-0,53 мМ EDTA в течение 5 мин при 37°C, промывали стерильным PBS, ресуспендировали в культуральной среде, подсчитывали и совместно культивировали с НК-клетками с использованием эффиктора:мишени (E:T) 10:1. Одновременно с этим в соответствующие лунки добавляли (+) цетуксимаб (McKesson Medical Surgical № 66733-948-23, лот № C1800115) и изотип IgG1 (Biolegend; LEAF Purified IgG1) в концентрации 30 мкг/мл перед инкубацией в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки промывали проточным буфером для окрашивания, блокировали Fc в течение 15 мин при 4°C и окрашивали поверхность (EpcAM, CD45, CD56, антитела, флуоресцентно конъюгированные с CD3) в течение 20 мин при 4°C в темноте. Клетки промывали в PBS и инкубировали при окрашивании на жизнеспособность 7-аминоактиномицином (7-AAD) в течение 30 мин при 4°C перед сбором для проточного цитометрического анализа с использованием Fortessa (BD). Процент целевых клеток 7-AAD+ CD45- EpcAM+ от общей популяции клеток представлял собой процент мертвых опухолевых клеток. Результаты представлены на фиг. 23А.

Эпителиальные/глочные клетки FaDu головы и шеи человека (ATCC № HTB-43) культивировали в минимальной питательной среде Игла (EMEM; ATCC+ 30-2003) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотика/антимикотика при 37°C в 5% CO₂. Клетки FaDu субкультивировали путем инкубирования в 0,25% трипсин-0,53 мМ EDTA в течение 5 мин при 37°C, промывали стерильным PBS, ресуспендировали в культуральной среде, подсчитывали и культивировали совместно с НК-клетками с использованием эффиктора:мишени (E:T) 10:1. Одновременно с этим в соответствующие лунки добавляли (+) цетуксимаб (McKesson Medical Surgical № 66733-948-23, лот № C1800115) и изотип IgG1 (Biolegend; LEAF Purified IgG1) в концентрации 300 нг/мл перед инкубацией в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки промывали проточным буфером для окрашивания, блокировали Fc в течение 15 мин при 4°C и окрашивали поверхность (CD45, CD56, антитела, флуоресцентно конъюгированные с CD3) в течение 20 мин при 4°C в темноте. Клетки промывали в PBS и инкубировали при окрашивании на жизнеспособность 7-аминоактиномицином (7-AAD) в течение 30 мин при 4°C перед сбором для проточного цитометрического анализа с использованием Fortessa (BD). Процент целевых клеток 7-AAD+ CD45- от общей популяции клеток представлял собой процент мертвых опухолевых клеток. Результаты представлены на фиг. 23В.

Как видно на фиг. 23А и 23В, НК-клетки человека, примированные моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкином-15, усиливали ADCC клеток солидных опухолей человека, покрытых цетуксимабом.

Пример 21. Оценка ингибирования роста опухоли на клеточной модели карциномы яичника SKOV-3 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к HER трастузумаба

Бестимусных мышей Balb/c (N=10/группа), которым подкожно в бок инокулировали 10 миллионов клеток SKOV-3, смешанных с матригелем в соотношении 1:1, обрабатывали всего шестью дозами трастузумаба (13,5 мг/кг, IV, вводимыми дважды в неделю в течение 3 недель, начиная с 6-го дня после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно), вводимыми через 6, 13 и 20 дней после инокуляции опухоли). Ингибирование роста опухоли у инокулированных мышей измеряли через 35 дней после начала обработки. Результаты представлены графическим образом на фиг. 24.

Как показано на фиг. 24, обработка с помощью комбинации моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 не приводила к ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. Мыши, получавшие трастузумаб, продемонстрировали 61% ингибирование роста опухоли, однако при обработке трастузумабом животных без опухолей получено не было. Напротив, обработка с помощью комбинации моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с трастузумабом приводила к полной утрате опухолей у всех обработанных животных, и при этом животные оставались без опухоли. Эти данные указывают на то, что комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с трастузумабом приводила к лучшему ингибированию роста опухоли по сравнению с обработкой трастузумабом как единственным средством в этой модели опухоли.

Пример 22. Оценка ингибирования роста опухоли на клеточной модели карциномы желудка NCI-N87 после введения длительно действующего агониста рецептора IL-15 и иллюстративного моноклонального антитела к HER трастузумаба

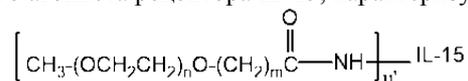
Бестимусных мышей Balb/c (N=10/группа), которым подкожно в бок инокулировали 10 миллионов клеток NCI-N87, смешанных с матригелем в соотношении 1:1, обрабатывали всего тремя дозами трастузумаба (первая доза 3 мг/кг и последующие две дозы 1 мг/кг, IV, вводили через 5, 12 и 20 дней после инокуляции) и всего тремя дозами моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкина-15 (соединение 1) (0,3 мг/кг, внутривенно), вводимых через 5, 12 и 19 дней после инокуляции опухоли. Ингибирование роста опухоли у инокулированных мышей измеряли через 25 дней после начала обработки. Результаты представлены графическим образом на фиг. 25.

Как показано на фиг. 25, обработка моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкином-15 не приводила к ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. Мыши, получавшие трастузумаб, продемонстрировали 29% ингибирование роста опухоли. Напротив, комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 и трастузумаба приводила к более высокому, 41% ингибированию роста опухоли у обработанных мышей. Эти данные указывают на то, что комбинация моно(метокси-PEG-N-бутанамида)интерлейкина-15 с трастузумабом приводила к лучшему ингибированию роста опухоли по сравнению с обработкой трастузумабом как единственным средством в этой модели опухоли.

Варианты осуществления настоящих способов, терапевтических комбинаций и наборов включают без ограничения следующие.

Вариант осуществления 1. Способ лечения субъекта, у которого имеется рак, предусматривающий введение субъекту:

(а) длительно действующего агониста рецептора IL-15, характеризующегося структурой



формула (I),

где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, n представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000, m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, n' равняется 1 и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; и

(б) антитела, направленного против опухоли, которое специфически связывается с опухолевым антигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста, где антитело характеризуется антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) как механизмом действия;

где стадии (а) и (б) осуществляют одновременно или последовательно и в любом порядке.

Вариант осуществления 2. Способ согласно варианту осуществления 1, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 3. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-2, где m в формуле (I) равняется 2 или 3.

Вариант осуществления 4. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-3, где m в формуле (I) равняется 3.

Вариант осуществления 5. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-4, где n в формуле (I) имеет значение приблизительно 909.

Вариант осуществления 6. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-5, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 выбран из (метокси-PEG-N-бутанамида)₂₀₋₆₀ κД-интерлейкина-15, (метокси-PEG-N-бутанамида)₂₀₋₄₀ κД-интерлейкина-15, (метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкина-15, моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₂₀₋₆₀ κД-интерлейкина-15, моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₂₀₋₄₀ κД-интерлейкина-15 и моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкина-15.

Вариант осуществления 7. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-6, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 представляет собой моно(метокси-PEG-N-бутанамида)₄₀ κД-интерлейкин-15.

Вариант осуществления 8. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-7, где рак представляет собой солидный рак.

Вариант осуществления 9. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-8, где солидный рак выбран из группы, состоящей из рака груди, рака яичника, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, злокачественной меланомы, рака печени, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, форм рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного протока, рака головного мозга, рака шейки матки, рака гайморовой пазухи, рака мочевого пузыря, рака пищевода, болезни Ходжкина и рака надпочечников, включая метастатические формы любого из вышеперечисленных.

Вариант осуществления 10. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-7, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

Вариант осуществления 11. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществле-

ния 1-7 и 10, где гематологическая злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лейкоза и лимфомы.

Вариант осуществления 12. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-7 и 10-11, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

Вариант осуществления 13. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-12, где стадию (а) осуществляют перед стадией (b).

Вариант осуществления 14. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-12, где стадию (b) осуществляют перед стадией (а).

Вариант осуществления 15. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-12, где стадию (а) и стадию (b) осуществляют одновременно или по сути одновременно.

Вариант осуществления 16. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-15, где указанное введение является эффективным для стимуляции активации НК в большей степени, чем наблюдаемая, в случае если либо длительно действующий агонист рецептора IL-15, либо антитело, направленное против опухоли, вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

Вариант осуществления 17. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-16, где указанное введение является эффективным для стимуляции пролиферации НК в большей степени, чем наблюдаемая, в случае если либо длительно действующий агонист рецептора IL-15, либо антитело, направленное против опухоли, вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

Вариант осуществления 18. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-17, где указанное введение является эффективным в отношении поддержания выживаемости CD8+ Т-клеток и формирования памяти в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда либо длительно действующий агонист рецептора IL-15, либо антитело, направленное против опухоли, вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

Вариант осуществления 19. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-18, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят внутривенно или подкожно.

Вариант осуществления 20. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-19, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят q7d, q14d, q21d (каждые 7 дней, каждые 14 дней, каждый 21 день), или ежемесячно, или в любой их комбинации.

Вариант осуществления 21. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-20, где антитело, направленное против опухоли, вводят внутривенно или внутривентриально.

Вариант осуществления 22. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-21, где антитело, направленное против опухоли, вводят q7d, q14d, q21d, или ежемесячно, или в любой их комбинации.

Вариант осуществления 23. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-22, где антитело, направленное против опухоли, представляет собой моноклональное антитело.

Вариант осуществления 24. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-23, где антитело, направленное против опухоли, выбрано из антитела к CD19, антитела к CD20 и антитела к CD38.

Вариант осуществления 25. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-23, где антитело, направленное против опухоли, которое специфически связывается с гликопротеином, выбрано из антитела к SLAMF7, антитела к EpCAM, антитела к gpA3 и антитела к FBP.

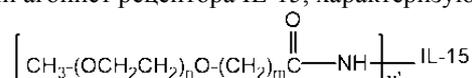
Вариант осуществления 26. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-23, где антитело, направленное против опухоли, которое специфически связывается с фактором роста, выбрано из антитела к VEGF, антитела к VEGFR и антитела к EGFR.

Вариант осуществления 27. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-23, где антитело, направленное против опухоли, представляет собой антитело типа IgG.

Вариант осуществления 28. Способ согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 1-23, где антитело, направленное против опухоли, выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, ритуксимаба, цетуксимаба и трастузумаба.

Вариант осуществления 29. Терапевтическая комбинация для применения в лечении рака, содержащая:

(а) длительно действующий агонист рецептора IL-15, характеризующийся структурой



формула (I),

где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, n представляет собой целое число от приблизительно 150 до приблизительно 3000, m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, n' равняется 1 и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; и

(b) антитело, направленное против опухоли, которое специфически связывается с опухолевым ан-

тигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста, где антитело, направленное против опухоли, предусматривает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) как механизм действия.

Вариант осуществления 30. Терапевтическая комбинация согласно варианту осуществления 29, где длительно действующий агонист рецептора представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 31. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-30, где m в формуле (I) равняется 2 или 3.

Вариант осуществления 32. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-31, где m в формуле (I) равняется 3.

Вариант осуществления 33. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-32, где n в формуле (I) имеет значение приблизительно 909.

Вариант осуществления 34. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-33, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 выбран из (метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₆₀ кД-интерлейкина-15, (метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₄₀ кД-интерлейкина-15, (метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₆₀ кД-интерлейкина-15, моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₂₀₋₄₀ кД-интерлейкина-15 и моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкина-15.

Вариант осуществления 35. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-34, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 представляет собой моно(метокси-PEG-N-бутанамид)₄₀ кД-интерлейкин-15.

Вариант осуществления 36. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-35, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 составлен для внутривенного или подкожного введения.

Вариант осуществления 37. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-36, где антитело, направленное против опухоли, составлено для внутривенного или внутрибрюшинного введения.

Вариант осуществления 38. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-37, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 составлен для внутривенного или подкожного введения.

Вариант осуществления 39. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-38, где антитело, направленное против опухоли, составлено для внутривенного или внутрибрюшинного введения.

Вариант осуществления 40. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-39, где антитело, направленное против опухоли, представляет собой моноклональное антитело.

Вариант осуществления 41. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-40, где антитело, направленное против опухоли, выбрано из антитела к CD19, антитела к CD20 и антитела к CD38.

Вариант осуществления 42. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-40, где антитело, направленное против опухоли, которое специфически связывается с гликопротеином, выбрано из антитела к SLAMF7, антитела к EpCAM, антитела к gpA3 и антитела к FBP.

Вариант осуществления 43. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-40, где антитело, направленное против опухоли, которое специфически связывается с фактором роста, выбрано из антитела к VEGF, антитела к VEGFR и антитела к EGFR.

Вариант осуществления 44. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-40, где антитело, направленное против опухоли, представляет собой антитело типа IgG.

Вариант осуществления 45. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-40, где антитело, направленное против опухоли, выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, ритуксимаба, цетуксимаба и трастузумаба.

Вариант осуществления 46. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-45, где рак представляет собой солидный рак.

Вариант осуществления 47. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-46, где солидный рак выбран из группы, состоящей из рака груди, рака яичника, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, злокачественной меланомы, рака печени, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, форм рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного протока, рака головного мозга, рака шейки матки, рака гайморовой пазухи, рака мочевого пузыря, рака пищевода, болезни Ходжкина и рака надпочечников, включая метастатические формы любого из вышеперечисленных.

Вариант осуществления 48. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-45, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

Вариант осуществления 49. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-45 и 48, где гематологическая злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лейкоза и лимфомы.

Вариант осуществления 50. Терапевтическая комбинация согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-45 и 48-49, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

Вариант осуществления 51. Набор, содержащий терапевтическую комбинацию согласно объединенным или отдельным вариантам осуществления 29-50 с прилагаемыми инструкциями по применению.

Вариант осуществления 52. Набор согласно варианту осуществления 51 с прилагаемыми инструкциями по применению, где каждый из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела содержится в одной или нескольких отдельных единичных лекарственных формах.

Вариант осуществления 53. Набор согласно варианту осуществления 51 с прилагаемыми инструкциями по применению, где каждый из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела содержится в одной единичной лекарственной форме.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 (ил-15)

```

10      20      30      40      50      60
MNVNVTSDLK KIEDLQSMH IDATLYTESB VHPCKVTAM KCPLELQVYI SLESQDASTE
70      80      90     100     110
DTVENLILLA NNSLSSNGHV TEGCKECEEE LERNIKERFL QSFVHIVQMF INTS

```

SEQ ID NO:2

```

-1      10      20      30      40      50      60
M NVNVTSDLK KIEDLQSMH IDATLYTESD VHPCKVTAM KCPLELQVYI SLESQDASTE
70      80      90     100     110
DTVENLILLA NNSLSSNGHV TEGCKECEEE LERNIKERFL QSFVHIVQMF INTS

```

SEQ ID NO:3

```

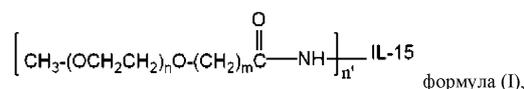
10      20      30      40      50      60
MRTKSPILRS ISTQCYKCLL LKSHFLTRAG TVEFDLQVFS AGLPKTEAWV VNVISDLKKT
70      80      90     100     110     120
EDLIQSMKTD ATLYTESDVE PCKVTAMKC FLEELQVLSI ESDQASTHEC VEWLITLANK
130     140     150     160
SLSSNGHVTE SGCKECEELE ERNIKERLQS FVHIVQMFIN TS

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, у которого имеется рак, предусматривающий введение субъекту:

(а) длительно действующего агониста рецептора интерлейкина-15 (IL-15), характеризующегося структурой



где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, n представляет собой целое число от 150 до 3000, m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, n' равняется 1 и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; и

(б) моноклонального антитела, которое специфически связывается с опухолевым антигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста, где моноклональное антитело характеризуется антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) как механизмом действия;

где стадии (а) и (б) осуществляют одновременно или последовательно и в любом порядке.

2. Способ по п.1, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п.1 или 2, где (m) в формуле (I) равняется 2 или 3.

4. Способ по любому из пп.1-3, где (m) в формуле (I) равняется 3.

5. Способ по любому из пп.1-4, где (n) в формуле (I) имеет значение 909.

6. Способ по любому из пп.1-5, где рак представляет собой солидный рак.

7. Способ по п.6, где солидный рак выбран из группы, состоящей из рака груди, рака яичника, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, злокачественной меланомы, рака печени, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, форм рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного протока, рака головного мозга, рака шейки матки, рака гайморовой пазухи, рака мочевого пузыря, рака пищевода, болезни Ходжкина и рака надпочечников, включая метастатические формы любого

из вышеперечисленных.

8. Способ по любому из пп.1-5, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

9. Способ по п.8, где гематологическая злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лейкоза и лимфомы.

10. Способ по любому из пп.1-9, где стадию (а) осуществляют перед стадией (b).

11. Способ по любому из пп.1-9, где стадию (b) осуществляют перед стадией (а).

12. Способ по любому из пп.1-9, где стадию (а) и стадию (b) осуществляют одновременно или по сути одновременно.

13. Способ по любому из пп.1-12, где указанное введение является эффективным для стимуляции активации НК в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

14. Способ по любому из пп.1-13, где указанное введение является эффективным для стимуляции пролиферации НК в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

15. Способ по любому из пп.1-14, где указанное введение является эффективным в отношении поддержания выживаемости CD8+ Т-клеток и формирования памяти в большей степени по сравнению с наблюдаемой в случае, когда длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят в виде единственного средства, что измеряется на подходящей животной модели.

16. Способ по любому из пп.1-15, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 вводят подкожно.

17. Способ по любому из пп.1-16, где моноклональное антитело вводят внутривенно.

18. Способ по любому из пп.1-17, где моноклональное антитело выбрано из антитела к CD19, антитела к CD20 и антитела к CD38.

19. Способ по любому из пп.1-17, где моноклональное антитело, которое специфически связывается с гликопротеином, выбрано из антитела к SLAMF7, антитела к EpCAM, антитела к 3 к грA3 и антитела к FBP.

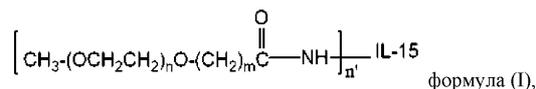
20. Способ по любому из пп.1-17, где моноклональное антитело, которое специфически связывается с фактором роста, выбрано из антитела к VEGF, антитела к VEGFR и антитела к EGFR.

21. Способ по любому из пп.1-17, где моноклональное антитело представляет собой антитело типа IgG.

22. Способ по любому из пп.1-17, где моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из даратумаба, ритуксимаба, цетуксимаба и трастузумаба.

23. Терапевтическая комбинация для лечения рака, содержащая:

(а) длительно действующий агонист рецептора интерлейкина-15 (IL-15), характеризующийся структурой



где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, n представляет собой целое число от 150 до 3000, m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, n' равняется 1 и -NH- представляет собой аминогруппу фрагмента IL-15; и

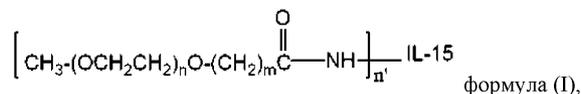
(b) моноклональное антитело, которое специфически связывается с опухолевым антигеном, выбранным из фосфопротеина, трансмембранного белка, гликопротеина, гликолипида и фактора роста, где моноклональное антитело предусматривает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) как механизм действия.

24. Терапевтическая комбинация по п.23, где длительно действующий агонист рецептора представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

25. Терапевтическая комбинация по п.23 или 24, где длительно действующий агонист рецептора IL-15 характеризуется структурой, описанной в любом из пп.3, 4 или 5.

26. Набор, содержащий терапевтическую комбинацию по любому из пп.23-25, для лечения рака с прилагаемыми инструкциями по применению, где каждый из длительно действующего агониста рецептора IL-15 и моноклонального антитела содержится в одной или нескольких отдельных единичных лекарственных формах.

27. Применение длительно действующего агониста рецептора интерлейкина-15 (IL-15), характеризующегося структурой



где IL-15 представляет собой фрагмент интерлейкина-15, n представляет собой целое число от 150

до 3000, m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4 и 5, n' равняется 1 и -NH- представляет собой аминокислотную последовательность фрагмента IL-15; для усиления антителозависимой клеточной токсичности, опосредованной NK-клетками, в случае введения с противоопухолевым антителом.

28. Способ по любому из пп.1-22 или комбинация по любому из пп.23-25, где IL-15 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-3, и аминокислотные последовательности, имеющие более чем 95% гомологичность с любой из SEQ ID NO: 1-3.

29. Способ по любому из пп.1-22 или комбинация по любому из пп.23-25, где аминокислотная группа выбрана из лизина или N-концевого амина.

SEQ ID NO:1

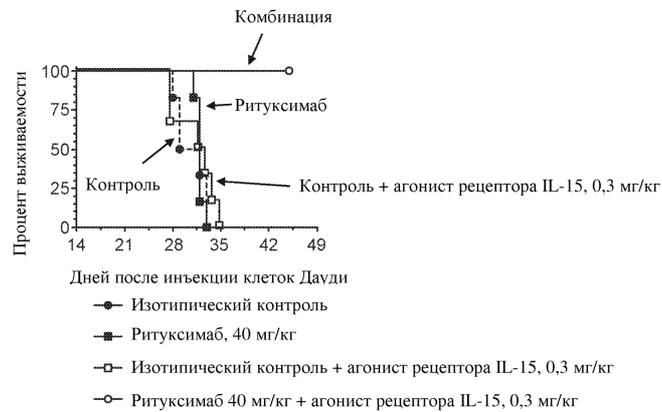
10 20 30 40 50 60

MNWNVVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLLELQV ISLESGDASI

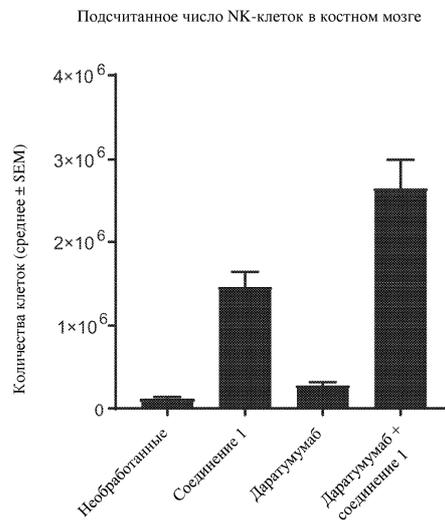
70 80 90 100 110

HDTVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHVIVQM FINTS

Фиг. 1

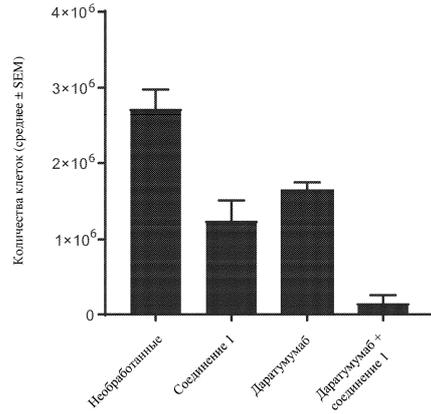


Фиг. 2



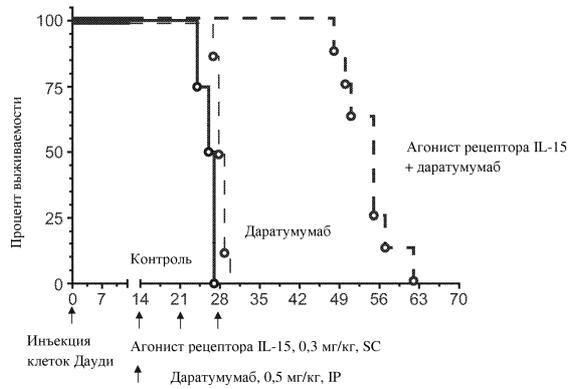
Фиг. 3

Подсчитанное число клеток Дауди (HLA-DR+) в костном мозге



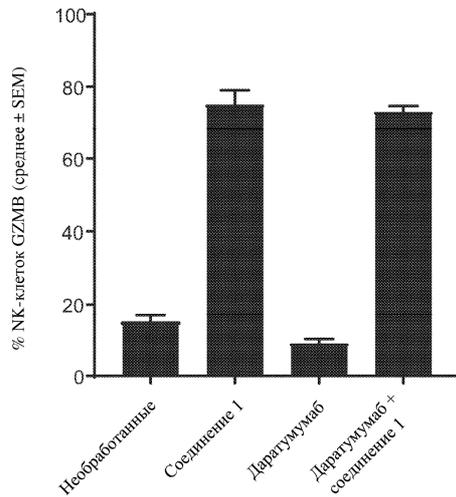
Фиг. 4

Модель выживаемости В-клеточной лимфомы Дауди

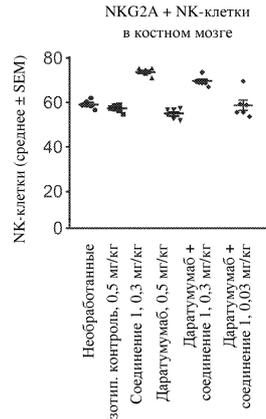


Фиг. 5

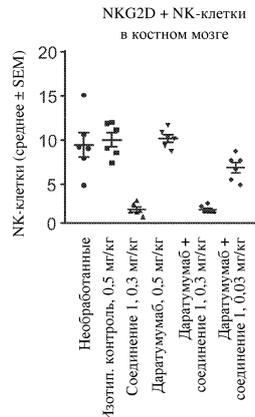
Индукция гранзима В в NK-клетках костного мозга



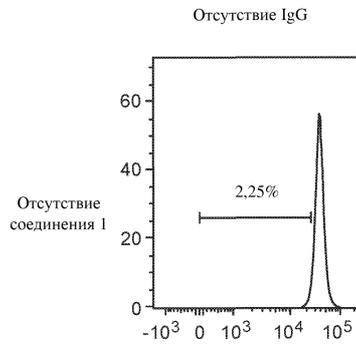
Фиг. 6



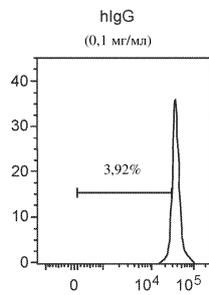
Фиг. 7А



Фиг. 7В

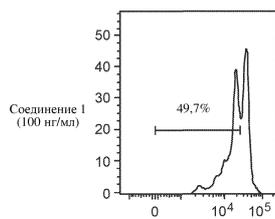


Фиг. 8А

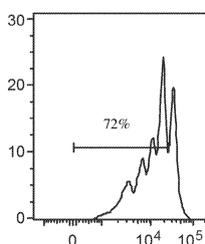


Фиг. 8В

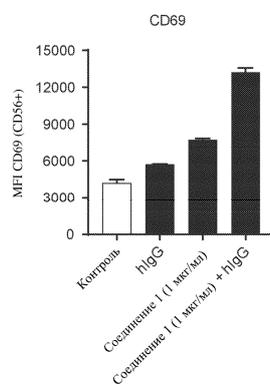
046466



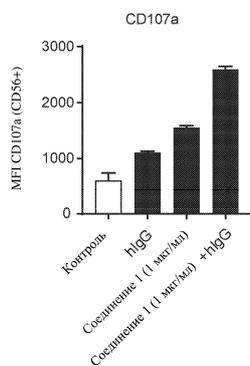
Фиг. 8С



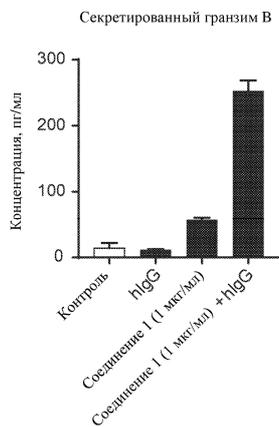
Фиг. 8D



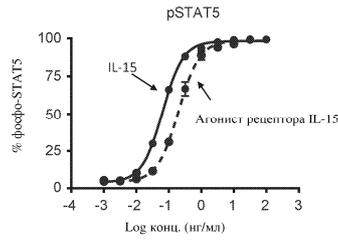
Фиг. 9А



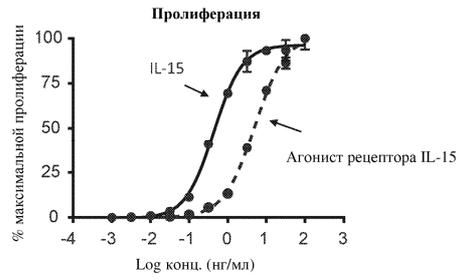
Фиг. 9В



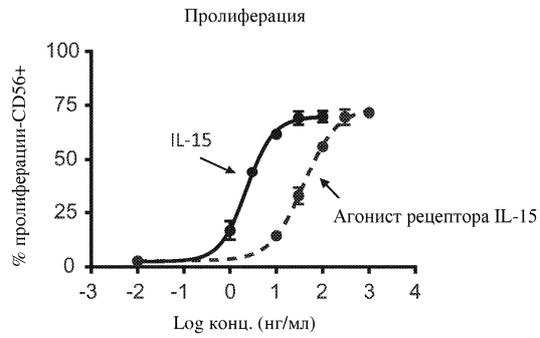
Фиг. 9С



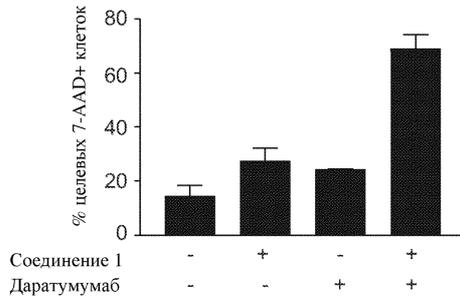
Фиг. 10А



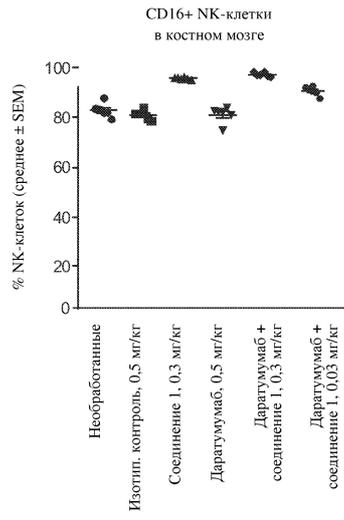
Фиг. 10В



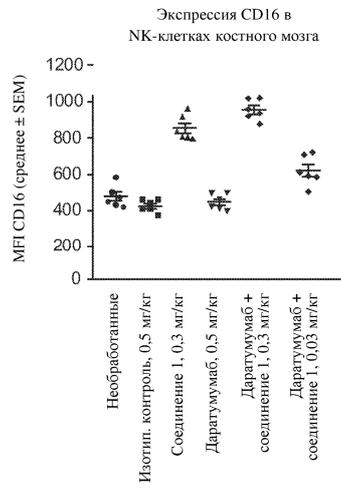
Фиг. 11



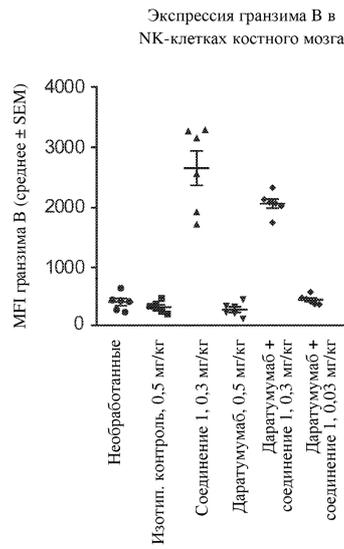
Фиг. 12



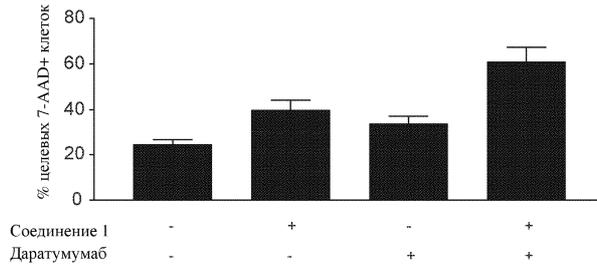
Фиг. 13А



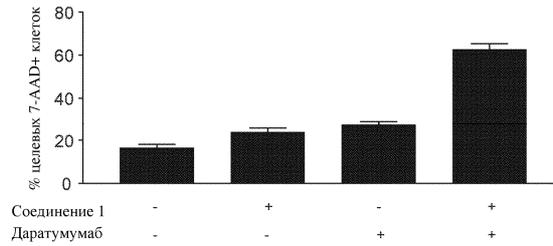
Фиг. 13В



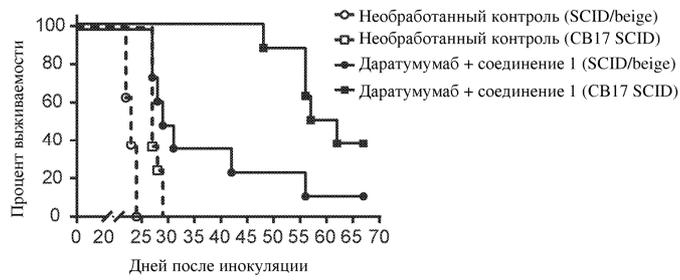
Фиг. 14



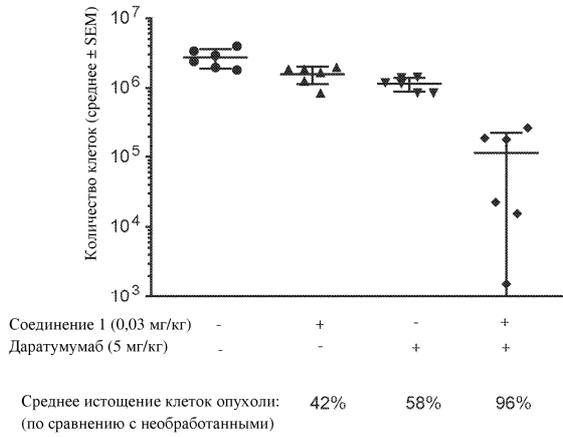
Фиг. 15А



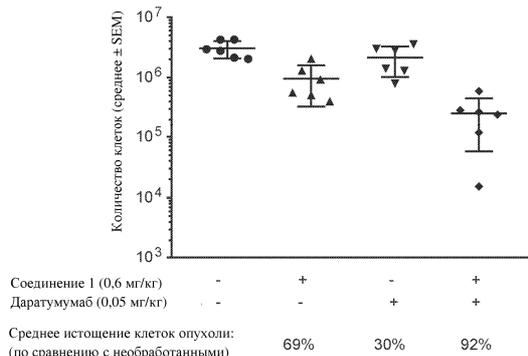
Фиг. 15В



Фиг. 16

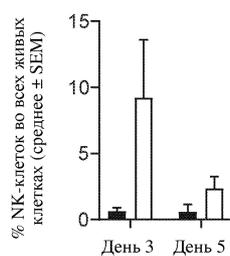


Фиг. 17А



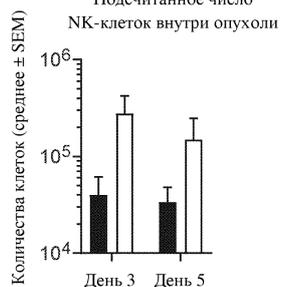
Фиг. 17В

Фракция NK-клеток
внутри опухоли



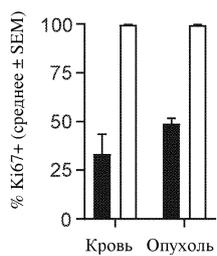
Фиг. 18А

Подсчитанное число
NK-клеток внутри опухоли



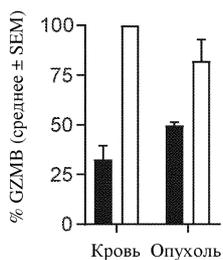
Фиг. 18В

Пролиферация
NK-клеток



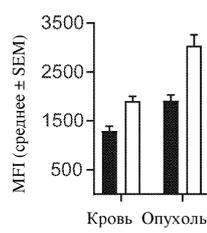
Фиг. 18С

Экспрессия GzmB
в NK-клетках

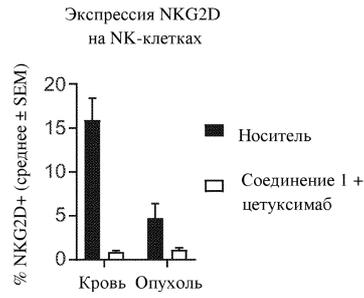


Фиг. 18D

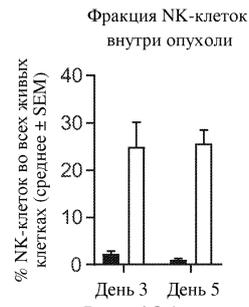
Поверхностная экспрессия CD16
на NK-клетках



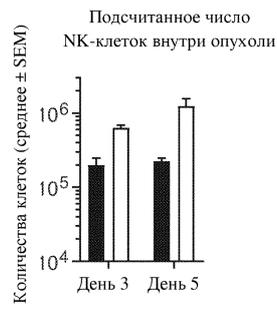
Фиг. 18Е



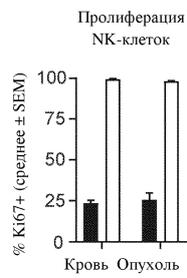
Фиг. 18F



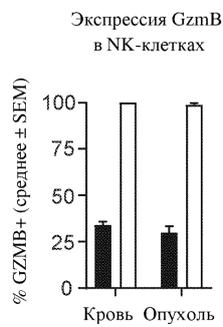
Фиг. 19А



Фиг. 19В

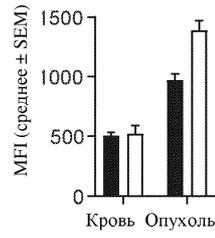


Фиг. 19С



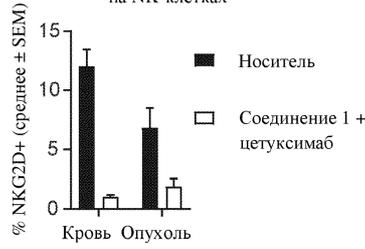
Фиг. 19D

Поверхностная экспрессия CD16 на NK-клетках



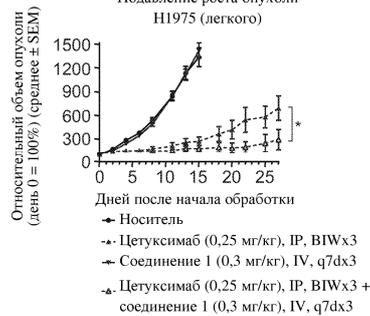
Фиг. 19Е

Экспрессия NKG2D на NK-клетках



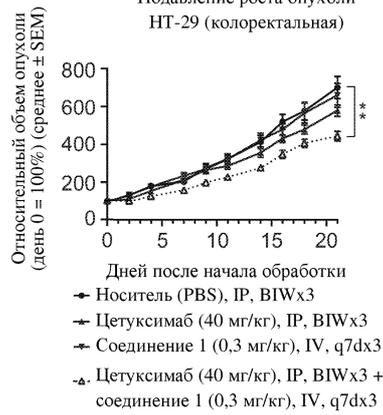
Фиг. 19F

Подавление роста опухоли Н1975 (легкого)

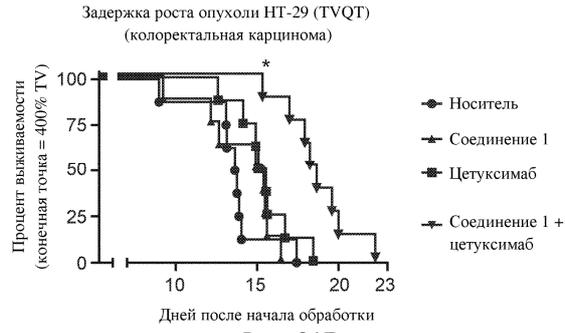


Фиг. 20

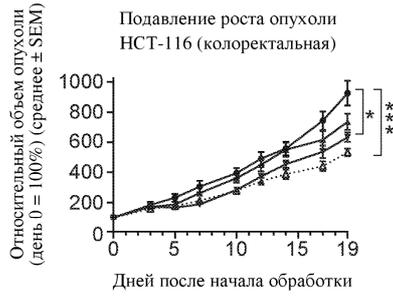
Подавление роста опухоли НТ-29 (колоректальная)



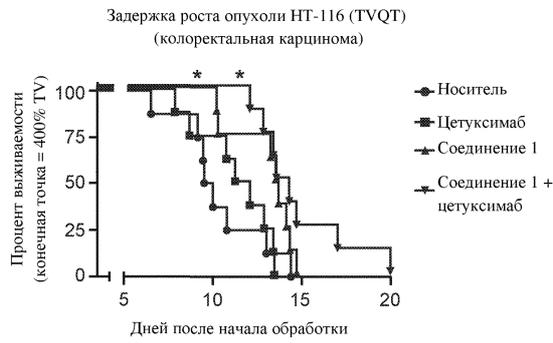
Фиг. 21А



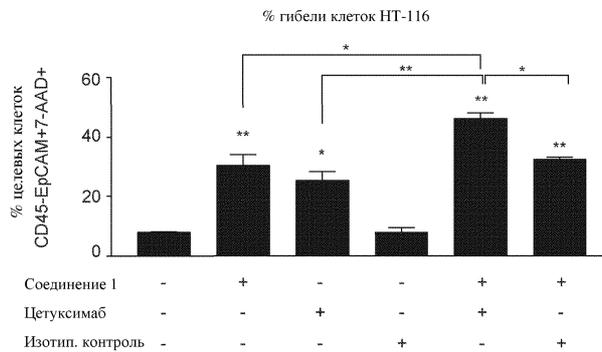
Фиг. 21В



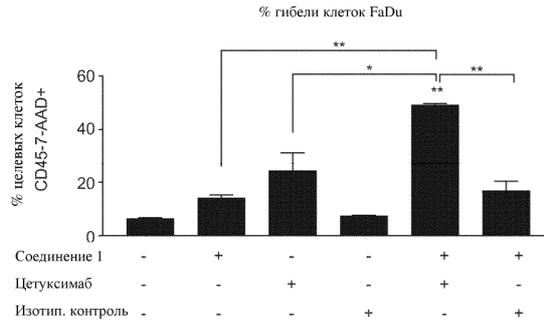
Фиг. 22А



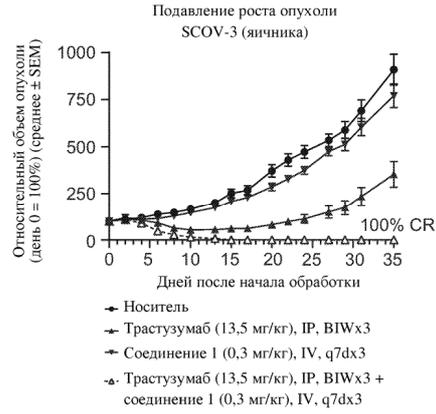
Фиг. 22В



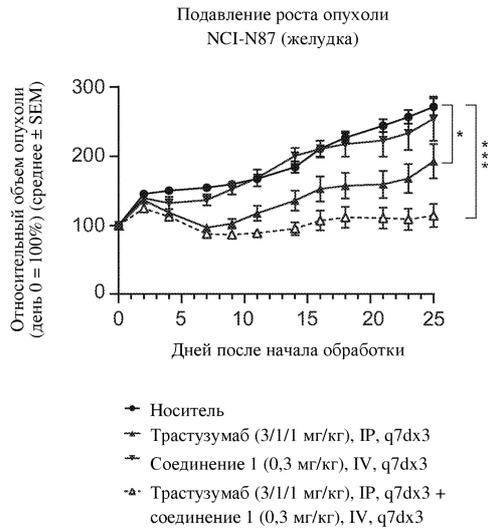
Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 24



Фиг. 25

