

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191292** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.12

(22) Дата подачи заявки
2019.11.15

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

(31) 62/767,515; 62/825,496; 62/930,399

(32) 2018.11.15; 2019.03.28; 2019.11.04

(33) US

(86) PCT/US2019/061837

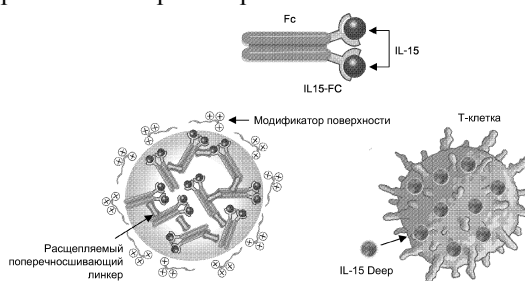
(87) WO 2020/102745 2020.05.22

(71) Заявитель:
ТОРК ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Андресен Томас Ларс (DK), Джоунс
Дуглас, Геретти Елена, Ахмад Гульзар
(US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Парамонова К.В. (RU)

(57) Описаны композиции и способы для иммунотерапии рака и, более конкретно, иммунные клетки, нагруженные белковыми кластерами и/или иммуностимулирующими слитыми молекулами (IFM), в комбинации с ингибитором ингибитора контрольных точек.



202191292

A1

A1

202191292

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 62/767515, поданной 15 ноября 2018, 62/825496, поданной 28 марта 2019, и 62/930399, поданной 4 ноября 2019, которые полностью включены в настоящее описание путем указания ссылки.

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Описанные здесь способы и композиции относятся к иммунотерапии рака, в частности получению и применению антиген-специфичных Т-лимфоцитов для терапии с применением иммунных клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Терапия с применением иммунных клеток, например адаптивная клеточная терапия (АСТ), включает этапы получения иммунных клеток от субъекта, экспансии клеток, и повторного введения клеток тому же субъекту или другому субъекту. Например, АСТ на основе полученных от донора подвергнутых *ex vivo* экспансии антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) человека является многообещающим подходом для лечения рака. Другие АСТ включают культивируемые опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), выделенные и подвергнутые экспансии клоны Т-клеток, и генетически модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки), которые экспрессируют традиционные Т-клеточные рецепторы или химерные антигенные рецепторы. Генетически модифицированные лимфоциты конструируют для уничтожения раковых клеток, экспрессирующих определенный антиген (антигены), и подвергают экспансии и доставляют пациенту. АСТ может обеспечивать получение опухоль-специфичных лимфоцитов (например, Т-клеток), которые приводят к снижению количества опухолевых клеток у пациента.

[0004] Однако противоопухолевая активность терапии на основе Т-клеток была ограничена вследствие недостаточной экспансии Т-клеток и иммуносупрессии, вызванной контрольными точками. Таким образом, существует потребность в улучшенных композициях и способах, которые могут обеспечивать преодоление данных ограничений.

РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Здесь описаны улучшенные способы и композиции для терапии на основе Т-клеток. Более конкретно, здесь описаны Т-клетки, подвергнутые модификации поверхности для несения сконструированных контейнеров в комбинации с ингибиторами ингибитора контрольных точек (например, антителом против PD-L1). В некоторых вариантах осуществления контейнеры могут содержать несколько терапевтических белковых мономеров (например, цитокинов, таких как IL-15), обратимо подвергнутых поперечному сшиванию с помощью биорасщепляемых линкеров. В других вариантах осуществления контейнеры могут представлять собой слитые белки, сконструированные для связывания с поверхностью иммунных клеток.

[0006] В рамках одного аспекта здесь описана терапевтическая композиция (например, предназначенная для иммунотерапии рака), включающая:

ядросодержащую клетку, нагруженную несколькими белковыми кластерами и/или иммуностимулирующими слитыми молекулами (IFM); и
ингибитор ингибитора контрольных точек.

[0007] В некоторых вариантах осуществления каждый белковый кластер может включать несколько терапевтических белковых мономеров, обратимо подвергнутых поперечному сшиванию друг с другом с помощью нескольких биорасщепляемых поперечносшивающих линкеров, при этом белковый кластер имеет размер от 30 нм до 1000 нм в диаметре при измерении с помощью динамического рассеяния света, при этом поперечносшивающий линкер расщепляется после введения нуждающемуся в этом субъекту при физиологических условиях с высвобождением терапевтических белковых мономеров из белкового кластера, при этом необязательно белковый кластер также включает модификацию поверхности, такую как поликатион, для обеспечения ассоциации белкового кластера с ядросодержащей клеткой.

[0008] В некоторых вариантах осуществления терапевтические белковые мономеры могут включать одну или несколько цитокиновых молекул и необязательно одну или несколько костимулирующих молекул, при этом:

- (i) указанная одна или несколько цитокиновых молекул выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1α, IL-1β, IL-5, IFNγ, TNFα, IFNα, IFNβ, GM-CSF, или GCSF; а
- (ii) указанная одна или несколько костимулирующих молекул выбраны из

CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40, или CD3.

[0009] В некоторых вариантах осуществления поперечносшивающий линкер может представлять собой расщепляемый или гидролизуемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой окислительно-восстановительный линкер. Примеры линкеров, а также способов получения и применения различных линкеров (например, для получения наногелей или контейнеров) описаны в РСТ заявке РСТ/US2018/049594, публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944 и публикации заявки на патент США 2014/0081012, каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

[0010] В определенных вариантах осуществления каждая IFM может быть сконструирована таким образом, чтобы включать иммуностимулирующую цитокиновую молекулу и часть для нацеливания (например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), имеющую аффинность к антигену на поверхности ядродержащей клетки, при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула является функционально связанной с частью для нацеливания. Примеры IFM (также обозначаемых как "связанный продукт слияния" или TF) описаны в международных РСТ публикациях WO 2019/010219 и WO 2019/010222, каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

[0011] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая цитокиновая молекула выбрана из одного или нескольких из IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, или IL-27, или их вариантных форм. Антиген может быть выбран из одного или нескольких из CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CD16, CD56, CD137, OX40, или GITR.

[0012] В одном варианте осуществления IFM содержит IL-12, например одноцепочечный IL-12p70, слитый с гуманизированным Fab против CD45. Одноцепочечный IL-12p70 может содержать IL-12B и IL-12A, соединенные гибким линкером.

[0013] В различных вариантах осуществления ядродержащая клетка и ингибитор ингибитора контрольных точек могут быть получены и введены по отдельности (например последовательно) пациенту, который нуждается, например, в иммунотерапии рака. В некоторых вариантах осуществления ядродержащая клетка

может быть получена из популяции Т-клеток, которые были обогащены или обучены для обладания специфичностью против одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА).

[0014] В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек может представлять собой один или несколько из PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, или CTLA-4. Ингибитор ингибитора контрольных точек может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается и нейтрализует или ингибирует ингибитор контрольных точек.

[0015] Также здесь предусмотрен способ осуществления иммунотерапии рака, включающий:

введение нуждающемуся в этом субъекту нескольких ядросодержащих клеток, нагруженных несколькими белковыми кластерами и/или IFM; и

введение пациенту ингибитора ингибитора контрольных точек.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0016] На Фиг.1 показан пример получения IL-15 DEEP™.

[0017] Фиг.2: IL-15 повышает экспрессию PD-1 в PMEL Т-клетках.

[0018] Фиг.3: Описание эксперимента в рамках Исследования 1 для комбинации на основе подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL и антитела против PD-L1.

[0019] Фиг.4: Исследование 1 показывает, что αPD-L1 повышает противоопухолевую активность подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL Т-клеток в присутствии лимфодеплеции (CPX).

[0020] Фиг.5: Исследование 1 показывает, что подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL Т-клетки в комбинации с αPD-L1 повышают противоопухолевую активность, повышают выживаемость без опухолей (TFS), не приводят к изменениям в плане действия IL15-Fc и хорошо переносятся без изменений в плане массы тела.

[0021] Фиг.6: Описание эксперимента в рамках Исследования 2 для комбинации на основе подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL и антитела против PD-L1.

[0022] Фиг.7: DP-15 PMEL + антитело против PD-L1 показывают улучшенную противоопухолевую активность и выживаемость по сравнению с PMEL + антителом против PD-L1.

[0023] Фиг.8: Исследование 2 показывает, что подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL T-клетки в комбинации с αPD-L1 повышают противоопухолевую активность, повышают выживаемость без опухолей (TFS), не приводят к изменениям в плане действия IL15-Fc и хорошо переносятся без изменений в плане массы тела.

[0024] Фиг.9: Описание эксперимента в рамках Исследования 3 для комбинации на основе подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ PMEL и антитела против PD-L1.

[0025] Фиг.10: Комбинация с αPD-L1 приводит к повышению активации PMEL T-клеток (секретированию IFN-γ) в опухоли.

[0026] Фиг.11: Анализ выживаемости мышей с опухолями, подвергнутых лечению опухольспецифичными T-клетками, связанными с IL-12 TF, с/без комбинации с блокадой PD-L1. Стрелки указывают количество дней терапии на основе адаптивного переноса опухольспецифичных клеток.

[0027] Фиг.12: концентрация IFNγ и PD-L1 в опухоли.

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0028] Иммуноterapia рака, включая терапию на основе адаптивных T-клеток, является многообещающей стратегией для лечения рака, поскольку она задействует собственную иммунную систему субъекта для атаки раковых клеток. Однако серьезным ограничением данного подхода является быстрое снижение жизнеспособности и функции переносимых T-лимфоцитов. Для поддержания высоких количеств жизнеспособных опухольспецифичных цитотоксических T-лимфоцитов в опухолях необходимо совместное введение иммуностимулирующих агентов с трансфецированными клетками. При систематическом введении с высокими дозировками данные агенты могут стимулировать *in vivo* жизнеспособность трансфецированных (то есть донорских) клеток, повышать терапевтическую функцию трансфецированных клеток, и, таким образом, приводить к общему повышению эффективности против рака; однако высокие дозировки подобных агентов могут также приводить к угрожающим жизни побочным эффектам. Например, применение интерлейкина-2 (IL-2) в качестве адьюванта сильно повышает эффективность адаптивной T-клеточной терапии при меланоме, при этом IL-2 обеспечивает ключевые адьювантные сигналы для трансфецированных T-клеток, но также вызывает серьезную ограничивающую дозировку воспалительную токсичность и экспансию регуляторных

Т-клеток (Трег). Один подход для фокусирования адъювантной активности на трансфицированных клетках заключается в генетической модификации трансфицированных клеток для секретирования их собственных поддерживающих факторов. Техническая сложность и вызовы, а также высокая стоимость крупномасштабного производства генетически модифицированных Т-лимфоцитов на сегодняшний день значительно ограничили потенциал данного способа в рамках клинического применения.

[0029] Здесь описана, в рамках некоторых аспектов, комбинационная терапия на основе ингибитора ингибитора контрольных точек и иммунных клеток, нагруженных терапевтическими белковыми кластерами или связанными продуктами слияния. Это обеспечивает простую, безопасную и эффективную доставку биологически активных агентов, таких как лекарство, белок (например, адъювантов, таких как IL-2) или частица в клетки на плазматической мембране иммунных клеток-мишеней, в то же время обеспечивая преодоление иммуносупрессии, вызванной контрольными точками, которая обычно связана с подобной клеточной терапией. В определенных вариантах осуществления подобная терапевтическая композиция на основе белкового кластера или связанного продукта слияния обозначается как "наногель", "наночастица", или "контейнер", при этом данные термины используются здесь взаимозаменяемым образом. В целях ясности термин "контейнер" может обозначать кластер поперечно сшитых вместе мономеров (например гетеродимеров IL15-Fc) или молекулу в виде связанного продукта слияния (TF) (например IL-12-TF, такую как продукт слияния IL-12 и антитела против CD45). Композиция может быть нагружена, присоединена, привязана или использована в качестве контейнера для клеток, например ядродержащих клеток. Процесс загрузки также обозначается здесь как "прайминг", при этом полученные клетки могут обозначаться как "подвергнутые праймингу" клетки. Снабженные контейнером или нагруженные или подвергнутые праймингу клетки могут иметь множество вариантов терапевтического применения. Например, нагруженные Т-клетки могут применяться в рамках терапии на основе Т-клеток, включая АСТ (адаптивную клеточную терапию). Другие важные типы иммунных клеток также могут быть нагружены, включая, например, В-клетки; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; NK-клетки; антиген-специфичные CD8⁺ Т-клетки; клетки, подвергнутые генетической модификации для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), или CAR-Т-клетки; клетки, подвергнутые генетической

модификации для экспрессии Т-клеточных рецепторов, являющихся специфичными для опухолевого антигена; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL); и/или антиген-обученные Т-клетки (например Т-клетки, которые были "обучены" с помощью антиген-презентирующих клеток (APC), несущих представляющие интерес антигены, например опухоль-ассоциированные антигены (ТАА)).

[0030] Неожиданным образом было открыто, что при лимфодеплеции антитело против PD-L1 также повышает противоопухолевую активность клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ (мультимера химически поперечно сшитых IL-15/IL-15 R α /Fc гетеродимеров (IL15-Fc)) или IL-12 DEEP™ (одноцепочечного IL-12p70, слитого с гуманизированным анти-CD45 Fab), синергетическим образом. То есть существует статистически значимое различие (повышение) в плане эффективности комбинации антитела против PD-L1 и IL-15 DEEP™ или DEEP™ IL-12 по сравнению с тем, что ожидалось бы в случае, если эффективность была бы исключительно аддитивной.

[0031] Помимо вышеуказанного, настоящее изобретение также охватывает другие наноструктуры, которые включают другие белковые терапевтические средства, для целей, отличных от адъювантного влияния на адаптивно перенесенные клетки. Специалистам в данной области будет очевидно, что изобретение имеет более широкие варианты применения, как описано здесь.

[0032] Различные аспекты настоящего изобретения могут использоваться самостоятельно, в комбинации, или в различном порядке, который явно не описан в рамках описанных выше вариантов осуществления, и, таким образом, оно не является ограниченным в плане вариантов своего применения на основе подробного описания и порядка компонентов, указанных в рамках вышеприведенного описания или проиллюстрированных на фигурах. Например, аспекты, описанные в рамках одного варианта осуществления, могут быть скомбинированы любым образом совместно с аспектами, описанными в рамках других вариантов осуществления.

Определения

[0033] Для удобства здесь собраны определенные термины, используемые в рамках описания, примеров, и прилагаемой формулы изобретения. Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, какое обычно понимается средним специалистом в области, к которой относится данное

изобретение.

[0034] В соответствии с используемым здесь значением, существительные в единственном числе обозначают один или несколько, например, по меньшей мере, один соответствующий указанному существительному грамматический объект. Использование существительных в единственном числе при их использовании вместе с термином "включающий" здесь может означать "один", но также соответствует значению "один или несколько", "по меньшей мере, один", и "один или более чем один".

[0035] В соответствии с используемым здесь значением, термины "около" и "приблизительно" в целом означают приемлемую степень отклонения для количества, измеряемого с учетом природы или точности измерений. Примеры степеней отклонения соответствуют рамкам в виде 20 процентов (%), обычно 10% и, более обычно, 5% указанного диапазона значений. Термин "по существу" означает более чем 50%, предпочтительно более чем 80% и, наиболее предпочтительно, более чем 90% или 95%.

[0036] В соответствии с используемым здесь значением, термин "включающий" или "включает" используется для обозначения композиций, способов, и их соответствующего компонента (компонентов), которые присутствуют в рамках соответствующего варианта осуществления, при этом он является открытым для включения неуказанных элементов.

[0037] В соответствии с используемым здесь значением, термин "состоящий по существу из" обозначает элементы, являющиеся необходимыми для соответствующего варианта осуществления. Данный термин допускает наличие дополнительных элементов, которые по своей природе не влияют на основную и связанную с новизной или функциональную характеристику (характеристики) соответствующего варианта осуществления изобретения.

[0038] Термин "состоящий из" обозначает композиции, способы и их соответствующие компоненты, как описано здесь, которые являются исключющими в плане любого элемента, не перечисленного в указанном описании соответствующего варианта осуществления.

[0039] В соответствии с используемым здесь значением, термин "несколько" обозначает более чем 1, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, например 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или более,

или любое целое число между ними.

[0040] Термин "терапевтический", "терапевтический агент", "активный", "активный агент", "активный фармацевтический агент", "активное лекарство" или "лекарство" в соответствии с используемым здесь значением означает любой активный фармацевтический ингредиент (API), включая его фармацевтически приемлемые соли (например гидрохлоридные соли, гидробромидные соли, гидроиодидные соли, и сахаринатные соли), а также находящийся в безводной, гидратированной и сольватированной форме, в форме пролекарств, и в форме индивидуально оптически активных энантиомеров API, а также полиморфов API. Терапевтические агенты включают фармацевтические, химические или биологические агенты. Кроме того, фармацевтические, химические или биологические агенты могут включать любой агент, который обладает требуемым свойством, или влияют на то, является ли он терапевтическим агентом. Например, агенты также включают диагностические агенты, биоциды, и им подобные.

[0041] Термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются здесь взаимозаменяемым образом для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты и он может прерываться отличными от аминокислот фрагментами. Данные термины также охватывают аминокислотный полимер, который подвергся модификации; например, образованию дисульфидной связи, гликозилированию, липидизации, ацетилированию, фосфорилированию, или любой другой манипуляции, такой как конъюгирование с компонентом-меткой. Полипептид может быть выделен из природных источников, может быть получен с помощью рекомбинантных способов из эукариотического или прокариотического хозяина, или может являться продуктом синтетических способов. Следует понимать, что термин "белок" включает слитые или химерные белки, а также цитокины, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

[0042] Термин "антитело" или "молекула антитела" в соответствии с используемым здесь значением означает белок, например цепь иммуноглобулина или его фрагмент, включающий, по меньшей мере, одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Молекула антитела охватывает антитела (например полноразмерные антитела) и фрагменты антител. В рамках одного варианта осуществления молекула антитела включает антигенсвязывающий или

функциональный фрагмент полноразмерного антитела или цепь полноразмерного иммуноглобулина. Например, полноразмерное антитело представляет собой молекулу (например, IgG) иммуноглобулина (Ig), которая встречается в природе или образуется с помощью рекомбинантных процессов на основе нормального фрагмента гена иммуноглобулина. В рамках вариантов осуществления термин "молекула антитела" обозначает иммунологически активную антигенсвязывающую часть молекулы иммуноглобулина, такую как фрагмент антитела. Фрагмент антитела, например функциональный фрагмент, представляет собой часть антитела, например Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, переменный фрагмент (Fv), доменное антитело (dAb), или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Функциональный фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным (например полноразмерным) антителом. Термины "фрагмент антитела" или "функциональный фрагмент" также включают выделенные фрагменты, состоящие из переменных участков, такие как "Fv" фрагменты, состоящие из переменных участком тяжелых и легких цепей, или рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых легкие и тяжелые переменные участки соединены пептидным линкером ("scFv белки"). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела не включает части антител без антигенсвязывающей активности, такие как Fc фрагменты или одиночные аминокислотные остатки. Примеры молекул антител включают полноразмерные антитела и фрагменты антител, например dAb (доменное антитело); имеющие одиночную цепь, Fab, Fab', и F(ab')₂ фрагменты; и одноцепочечные переменные фрагменты (scFvs). Термины "Fab" и "фрагмент Fab" используются взаимозаменяемо образом и обозначают участок, который включает один константный и один переменный домен из каждой тяжелой и легкой цепи антитела, то есть V_L, C_L, V_H, и C_{H1}.

[0043] В рамках вариантов осуществления молекула антитела является моноспецифичной, например она имеет специфичность связывания в отношении одного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела является мультиспецифичной, например она имеет несколько последовательностей переменного домена иммуноглобулина, при этом первая последовательность переменного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В

некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой биспецифичную молекулу антитела. Термин "биспецифичная молекула антитела" в соответствии с используемым здесь значением обозначает молекулу антитела, которая имеет специфичность в отношении более чем одного (например двух, трех, четыре или более) эпитопов и/или антигенов.

[0044] Термин "антиген" (Ag) в соответствии с используемым здесь значением обозначает макромолекулу, включая все белки или пептиды. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой молекулу, которая провоцирует иммунный ответ, например активирующую определенные иммунные клетки и/или продуцирование антител. Антигены участвуют не только в продуцировании антител. Т-клеточные рецепторы также распознают антигены (хотя и антигены, чьи пептиды или пептидные фрагменты образуют комплекс с молекулой МНС). Любая молекула, включая практически все белки или пептиды, может являться антигеном. Антигены также могут быть получены на основе геномного рекомбинанта или ДНК. Например, любая ДНК, включающая нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, способный вызывать иммунный ответ, кодирует "антиген". В рамках вариантов осуществления антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена, при этом антиген также вовсе не обязательно должен кодироваться геном. В рамках вариантов осуществления антиген может быть синтезирован или может быть получен из биологического образца, например образца ткани, образца опухоли, клетки или жидкости с другими биологическими компонентами. В соответствии с используемым здесь значением, термин "опухолевый антиген" или, взаимозаменяемым образом, "раковый антиген" включает любую молекулу, присутствующую или связанную с раком, например раковой клеткой или микросредой опухоли, которая может провоцировать иммунный ответ. В соответствии с используемым здесь значением, термин "антиген иммунной клетки" включает любую молекулу, присутствующую или связанную с иммунной клеткой, которая может провоцировать иммунный ответ.

[0045] Термин "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" молекулы антитела (используются здесь взаимозаменяемым образом) обозначает часть молекулы антитела, например молекулы иммуноглобулина (Ig), такой как IgG, которая участвует в связывании антигена. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками переменных (V) участков тяжелых (H) и легких (L) цепей. Три сильно дивергентных участка в рамках переменных участков тяжелых и легких цепей, обозначаемые как гиперпеременные участки, располагаются между более консервативными фланкирующими участками, называемыми "каркасными участками" (FR). FR представляют собой аминокислотные последовательности, которые естественным образом встречаются между и по соседству с гиперпеременными участками в иммуноглобулинах. В рамках вариантов осуществления в молекуле антитела указанные три гиперпеременных участка легкой цепи и три гиперпеременных участка тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности, которая является комплементарной по отношению к трехмерной поверхности связываемого антигена. Указанные три гиперпеременных участка каждой из тяжелой и легкой цепей обозначаются как "определяющие комплементарность участки" или "CDR". Каркасный участок и CDR были определены и описаны, например, у Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, и Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917. Каждая переменная цепь (например переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь) обычно состоит из трех CDR и четырех FR, которые располагаются от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, и FR4. CDR переменной легкой цепи (VL) в целом определяются в качестве включающих остатки в положениях 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2), и 91-97 (CDR3). CDR переменной тяжелой цепи (VH) в целом определяются в качестве включающих остатки в положениях 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2), и 95-102 (CDR3). Среднему специалисту в данной области будет очевидно, что петли могут иметь различную длину в зависимости от антитела, при этом системы нумерации, такие как Kabat или Chotia, обеспечивают единообразную нумерацию каркасов в рамках различных антител.

[0046] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела (например при включении в качестве части слитой молекулы) может иметь недостаток или вовсе не иметь полноразмерный Fc домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент не включает полноразмерный IgG или полный Fc или может включать один или несколько константных участков (или их

фрагментов) из легких и/или тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть полностью свободным от какого-либо Fc домена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может являться по существу свободным от полноразмерного Fc домена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может включать часть полноразмерного Fc домена (например CH2 или CH3 домен или его часть). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может включать полноразмерный Fc домен. В некоторых вариантах осуществления Fc домен представляет собой домен IgG, например Fc домен IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает домен CH2 и домен CH3.

[0047] В соответствии с используемым здесь значением, термин "цитокин" или "молекула цитокина" обозначает полноразмерный, представляющий собой фрагмент или вариант встречающегося в природе цитокина дикого типа (включая его фрагменты и функциональные варианты, имеющие, по меньшей мере, 10% активности встречающейся в природе молекулы цитокина). В рамках вариантов осуществления молекула цитокина имеет, по меньшей мере, 30%, 50%, или 80% активности, например иммуномодулирующей активности, относительно встречающейся в природе молекулы. В определенных вариантах осуществления цитокины включают интерлейкины (например IL-2, IL-7, IL-15, IL-10, IL-18, IL-21, IL-23, IL-12, IFN-гамма, IFN-альфа, GM-CSF, FLT3-лиганд, или суперагонистные/мутантные формы данных цитокинов, такие как IL-15SA). В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен, необязательно связанный с Fc участком иммуноглобулина. В рамках других вариантов осуществления молекула цитокина связана с Fc участком иммуноглобулина. В рамках других вариантов осуществления молекула цитокина связана с молекулой антитела (например Fab или scFv фрагментом иммуноглобулина, Fab фрагментом, FAb₂ фрагментом, или фрагментом или производным аффитела, например фрагментом sdAb (нанотела), фрагментом тяжелой цепи антитела, однодоменным антителом, биспецифичным или мультиспецифичным антителом), или с не относящимися к антителам каркасами и миметиками антител (например липокалинами (например антикалинами), аффителами, фибронектином (например монотелами или аднектинами), ноттинами, анкириновыми повторами (например DARPинами), и А доменами (например, авимерами)).

[0048] В соответствии с используемым здесь значением, термин "иммуностимулирующая слитая молекула" (IFM; используется взаимозаменяемым образом с термином "связанный продукт слияния") обозначает химерную молекулу, включающую иммуностимулирующую часть и часть для нацеливания иммунных клеток. Часть для нацеливания иммунных клеток может включать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий аффинность в отношении антигена на поверхности иммунной клетки-мишени. Иммуностимулирующая молекула цитокина может быть функционально связана с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например с помощью линкера. Примеры связанного слитого белка (например, продукта слияния IL-15 и продукта слияния IL-12) описаны в международных РСТ заявках РСТ/US2018/040777, РСТ/US2018/040783 и РСТ/US2018/040786, все из которых приведены здесь в качестве ссылки.

[0049] В соответствии с используемым здесь значением, термин "введение" и аналогичные термины обозначают доставку композиции подвергнутому лечению субъекту. Композиции настоящего изобретения предпочтительно вводятся, например, парентерально, включая подкожное, внутримышечное, или предпочтительно внутривенное введение.

[0050] В соответствии с используемым здесь значением, термины "рак" и "раковый" обозначают или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но без ограничения, меланому, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры данных видов рака включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак кишечника или желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак ободочной кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, карциному заднего прохода, карциному пениса, а также рак головы и шеи.

[0051] "Ядродержащие клетки" представляют собой клетки, которые содержат ядра.

В некоторых вариантах осуществления ядросодержащие клетки могут представлять собой иммунные клетки, такие как иммунные эффекторный клетки.

[0052] В соответствии с используемым здесь значением, термин "иммунная клетка" обозначает любую из различных типов клеток, которые функционируют в рамках иммунной системы, например для защиты против инфекционных агентов и чужеродных веществ. В рамках вариантов осуществления данный термин включает лейкоциты, например нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты. Термин "иммунная клетка" включает описанные здесь иммунные эффекторные клетки. Термин "иммунная клетка" также обозначает модифицированные версии клеток, участвующих в иммунном ответе, например модифицированные NK-клетки, включая линию NK-клеток NK-92 (ATCC кат. номер CRL-2407), haNK (вариант NK-92, который экспрессирует Fc рецептор FcγRIIIa (158V) с высокой аффинностью) и taNK (нацеленные NK-92 клетки, трансфецированные геном, который экспрессирует CAR для соответствующего опухолевого антигена), например как описано у Klingemann *et al.* выше.

[0053] Термин "иммунная эффекторная клетка" в соответствии с используемым здесь значением обозначает клетку, которая участвует в иммунном ответе, например при промотировании иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают, но без ограничения, Т-клетки, например CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, альфа Т-клетки, бета Т-клетки, гамма Т-клетки, и дельта Т-клетки; В-клетки; природные киллерные (NK) клетки; природные киллерные Т-клетки (NKT); дендритные клетки и тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку (например Т-клетку или NK-клетку), которая включает, например экспрессирует, химерный антигенный рецептор (CAR), например CAR, который связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления иммунная клетка экспрессирует экзогенный Fc рецептор с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка включает, например, экспрессирует модифицированный Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой опухоль-инфильтрирующий лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию иммунных клеток и включают Т-клетки, которые были обогащены в плане специфичности в отношении опухоль-ассоциированного антигена (ТАА), например обогащены путем сортировки Т-клеток со специфичностью в

отношении МНС с представляющим интерес ТАА, например MART-1. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию иммунных клеток и включают Т-клетки, которые были "обучены" для получения специфичности против ТАА с помощью антигенпрезентирующей клетки (АРС), например дендритной клетки с представляющими интерес ТАА пептидами. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются обученными против ТАА, выбранного из одного или нескольких из MART-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX2, сурвивина, и других. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию Т-клеток, которые были "обучены" для получения специфичности против нескольких ТАА с помощью АРС, например дендритной клетки с множеством представляющих интерес ТАА пептидов. Подобные Т-клетки также обозначаются здесь как Т-клетки с несколькими мишенями ("МТС"). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку (например CD8⁺ Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой хелперную Т-клетку, например CD4⁺ Т-клетку.

[0054] "Опухоль-ассоциированный антиген" (ТАА) представляет собой антигенное вещество, продуцируемое в опухолевых клетках, которое запускает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены представляют собой полезные маркеры опухолей при идентификации опухолевых клеток с помощью диагностических тестов, а также являются потенциальными кандидатами для применения в рамках терапии рака. В некоторых вариантах осуществления ТАА может происходить из рака, включая, но без ограничения, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, различные виды лейкоза, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак груди, рак простаты, рак яичника, рак поджелудочной железы и им подобных. ТАА могут являться пациент-специфичными. В некоторых вариантах осуществления ТАА могут представлять собой p53, Ras, бета-катенин, CDK4, альфа-актинин-4, тирозиназу, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART 1, ганглиозиды, PSMA, HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20, MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, теломеразу, сурвивин, или любую их комбинацию. Примеры ТАА включают предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), синовиальную саркому X (SSX) контрольной точки 2 (SSX2), NY-ESO-1, сурвивин и ген опухоли Вильмса 1 (WT-1).

[0055] В соответствии с используемым здесь значением, термин "цитотоксические Т-лимфоциты" (CTL) обозначает Т-клетки, которые имеют способность убивать клетку-мишень. Активация CTL может осуществляться после двух следующих этапов: 1) осуществления взаимодействия между связанной с антигеном молекулой МНС на клетке-мишени и Т-клеточным рецептором на CTL; и 2) передачи костимулирующего сигнала путем активации костимулирующих молекул на Т-клетке и клетке-мишени. Затем CTL распознают конкретные антигены на клетках-мишенях и индуцируют разрушение данных клеток-мишеней, например с помощью лизиса клеток. В некоторых вариантах осуществления CTL экспрессирует CAR. В некоторых вариантах осуществления CTL экспрессирует модифицированный Т-клеточный рецептор.

[0056] В соответствии с используемым здесь значением, термин "эффективное количество" обозначает количество биоактивного агента или диагностического агента, которое является достаточным для обеспечения требуемого местного или системного эффекта при приемлемом соотношении риска/пользы, например в рамках любого вида медицинского лечения или диагностического теста. Оно будет варьироваться в зависимости от пациента, заболевания, вида лечения и природы агента.

[0057] В соответствии с используемым здесь значением, термин "фармацевтически приемлемый" обозначает способность использоваться при получении фармацевтической композиции, которая является в целом безопасной, нетоксичной, и не является биологически или иным образом нежелательной, а также приемлемость для использования в ветеринарии и в рамках фармацевтического применения для людей. Примеры "фармацевтически приемлемых жидких носителей" включают воду и органические растворители. Предпочтительные фармацевтически приемлемые водные жидкости включают PBS, солевой раствор, растворы на основе декстрозы, и так далее.

[0058] Термин "лечение" обозначает введение лекарства для целей, включающих: (i) предотвращение заболевания или состояния, то есть предотвращение возникновения клинических симптомов заболевания или состояния; (ii) ингибирование заболевания или состояния, то есть остановку развития клинических симптомов; и/или (iii) облегчение заболевания или состояния, то есть вызывание регрессии клинических симптомов.

[0059] Термин "субъект" включает живые организмы, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающих, человека). В одном варианте осуществления субъект представляет собой пациента, например пациента,

нуждающегося в терапии на основе иммунных клеток. В другом варианте осуществления субъект представляет собой донора, например аллогенного донора иммунных клеток, например предназначенных для аллогенной трансплантации.

[0060] Термин "аутологичный" обозначает любой материал, полученный от того же субъекта, которому он будет позже повторно введен.

[0061] Термин "по существу очищенная клетка" обозначает клетку, которая является по существу свободной от клеток других типов и/или была подвергнута обогащению относительно клеток других типов в рамках исходной популяции. Термин "по существу очищенная клетка" также обозначает клетку, которая была отделена от клеток других типов, с которыми она обычно связана в рамках своего естественного встречающегося в природе состояния. В некоторых случаях термин "популяция по существу очищенных клеток" обозначает гомогенную популяцию клеток. В других случаях данный термин просто обозначает клетку, которая была отделена от клеток, с которыми она обычно связана в рамках своего естественного встречающегося в природе состояния. В некоторых вариантах осуществления данные клетки культивируют *in vitro*. В других аспектах данные клетки не культивируют *in vitro*.

[0062] Различные аспекты изобретения будут описаны более подробно ниже. Дополнительные определения приведены в рамках всего объема описания.

Мономеры

[0063] Примеры белковых мономеров для использования в соответствии с настоящим изобретением включают, без ограничения, антитела (например IgG, Fab, смешанные Fc и Fab), одноцепочечные антитела, фрагменты антител, модифицированные белки, такие как продукты слияния Fc, ферменты, кофакторы, рецепторы, лиганды, факторы транскрипции и другие регуляторные факторы, цитокины, хемокины, альбумин сыворотки человека и им подобные. Данные белки могут являться или не являться встречающимися в природе. Другие белки также охватываются и могут применяться в рамках изобретения. Любой из данных белков может быть обратимо модифицирован с помощью поперечного сшивания с образованием кластера или структуры в виде наногеля, как описано, например, в публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944, публикации заявки на патент США 2014/0081012, и РСТ заявке РСТ/US17/37249, поданной 13 июня 2017, все из которых приведены здесь в качестве ссылки.

[0064] В различных вариантах осуществления терапевтические белковые мономеры могут являться поперечно сшитыми с помощью одного или нескольких описанных здесь поперечносшивающих линкеров. Терапевтические белковые мономеры могут включать одну или несколько цитокиновых молекул и необязательно одну или несколько костимулирующих молекул. Цитокиновые молекулы могут быть выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1альфа, IL-1бета, IL-5, IFNгамма, TNFa, IFNальфа, IFNбета, GM-CSF или GCSF. Костимулирующие молекулы выбраны из CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40 или CD3.

[0065] В некоторых вариантах осуществления белковые мономеры согласно изобретению представляют собой иммуностимулирующие белки. В соответствии с используемым здесь значением, иммуностимулирующий белок представляет собой белок, который стимулирует иммунный ответ (включая стимулирование предварительно существующего иммунного ответа) у субъекта, которому он вводится, самостоятельно или в комбинации с другим белком или агентом. Примеры иммуностимулирующих белков, которые могут применяться в соответствии с изобретением, включают, без ограничения, антигены, адъюванты (например флагеллин, мурамилдипептид), цитокины, включая интерлейкины (например IL-2, IL-7, IL-15, IL-10, IL-18, IL-21, IL-23 (или суперагонистные/мутантные формы данных цитокинов, такие как IL-15SA), IL-12, IFN-гамма, IFN-альфа, GM-CSF, FLT3-лиганд), и иммуностимулирующие антитела (например, антитело против CTLA-4, антитело против CD28, антитело против CD3, или одноцепочечное антитело/фрагменты антител данных молекул). Другие иммуностимулирующие белки также охватываются и могут применяться в рамках изобретения. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие белки могут представлять собой антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, который связывает ингибитор иммуносупрессора, например ингибитор ингибитора контрольных точек, такой как PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, ингибиторный KIR, CD276, VTCN1, BTLA/HVEM, HAVCR2 и ADORA2A, например как описано в заявке на патент США 2016/0184399, которая приведена здесь в качестве ссылки.

[0066] В некоторых вариантах осуществления белковые мономеры согласно изобретению представляют собой антигены. Примеры антигенов, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают, без ограничения,

раковые антигены, аутоантигены, микробные антигены, аллергены и природные антигены. Другие белковые антигены также охватываются и могут применяться в рамках изобретения.

[0067] В некоторых вариантах осуществления белки согласно изобретению представляют собой раковые антигены. Раковый антиген представляет собой антиген, который экспрессируется предпочтительно раковыми клетками (то есть он экспрессируется с высокими уровнями в раковых клетках или нераковых клетках) и, в некоторых случаях, экспрессируется исключительно раковыми клетками. Раковые антигены могут быть экспрессированы в раковой клетке или на поверхности раковой клетки. Раковые антигены, которые могут применяться в соответствии с описанием, включают, без ограничения, MART-1/Melan-A, gp100, связывающий аденозиндезаминазу белок (ADAbp), FAP, циклофилин b, колоректальный ассоциированный антиген (CRC)-0017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, простатспецифический антиген (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), Т-клеточный рецептор/CD3-дзета-цепь и CD20. Раковый антиген может быть выбран из группы, состоящей из MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4 и MAGE-C5. Раковый антиген может быть выбран из группы, состоящей из GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8 и GAGE-9. Раковый антиген может быть выбран из группы, состоящей из BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназы, p53, семейства MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -фетопротеина, Е-кадгерина, α -катенина, β -катенина, γ -катенина, p120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белка аденоматозного полипоза coli (APC), фодрина, коннексина 37, Ig идиотипа, p15, gp75, ганглиозида GM2, ганглиозида GD2, белка вируса папилломы человека, семейства опухолевых антигенов Smad, Imp-1, P1A, EBV-кодируемого ядерного антигена (EBNA)-1, гликогенфосфорилазы мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7, CD20 и c-erbB-2. Другие раковые антигены также охватываются и могут применяться в рамках изобретения.

[0068] В некоторых вариантах осуществления белки согласно описанию представляют собой антитела или фрагменты антител, включая, без ограничения, бевацизумаб

(AVASTIN®), трастузумаб (HERCEPTIN®), алемтузумаб (CAMPATH®, показан для В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза), гемтузумаб (MYLOTARG®, hP67.6, анти-CD33, показан при лейкозе, таком как острый миелоидный лейкоз), ритуксимаб (RITUXAN®), тозитумомаб (BEXXAR®, анти-CD20, показан при злокачественных В-клеточных новообразованиях), MDX-210 (биспецифическое антитело, которое одновременно связывается с онкогенным белковым продуктом HER-2/neu и рецепторами Fc типа I иммуноглобулина G (IgG) (Fc гамма RI)), ореговомаб (OVAREX®, показан при раке яичника), эдреколомаб (PANOREX®), даклизумаб (ZENAPAX®), паливизумаб (SYNAGIS®, показан при респираторных заболеваниях, таких как RSV-инфекция), ибритумомаб тиуксетан (ZEVALIN®, показан при неходжкинской лимфоме), цетуксимаб (ERBITUX®), MDX-447, MDX-22, MDX-220 (анти-TAG-72), IOR-05, IOR-T6 (анти-CD1), IOR EGF/R3, целоговаб (ONCOSCINT® OV103), эпрутузумаб (LYMPHOCIDE®), пемтумомаб (THERAGYN®) и глиомаб-Н (показан при раке мозга, меланоме). Другие антитела и фрагменты антител также охватываются и могут применяться в рамках изобретения.

[0069] Белки могут являться соединенными (например ковалентно соединенными) с расщепляемым линкером через терминальные или внутренние нуклеофильные группы, такие как —NH_2 функциональная группа (например боковая цепь лизина). Например, белки могут подвергаться контактированию с расщепляемым линкером при условиях, которые обеспечивают обратимое ковалентное поперечное сшивание белков друг с другом через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления белки могут быть поперечно сшиты с образованием нескольких белковых наногелей. В некоторых вариантах осуществления данные условия включают подвергание белка контактированию с расщепляемым линкером в водном буфере при температуре от 4°C до 25°C . В некоторых вариантах осуществления этап контактирования может быть осуществлен в водном буфере в течение от 30 минут до одного часа. В некоторых вариантах осуществления водный буфер включает фосфатный буферный солевой раствор (PBS). В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в водном буфере составляет от 10 мг/мл до 50 мг/мл (например 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл).

Цитокины

[0070] Описанные здесь способы и композиции, например линкерные соединения,

могут применяться для поперечного сшивания одной или нескольких цитокиновых молекул. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой полноразмерную молекулу, фрагмент или вариант цитокина, например цитокина, включающего одну или несколько мутаций. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает цитокин, выбранный из интерлейкина-1 альфа (IL-1 альфа), интерлейкина-1 бета (IL-1 бета), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-5 (IL-5), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-10 (IL-10), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-17 (IL-17), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23), интерферона (IFN) альфа, IFN бета, IFN гамма, некроза опухоли альфа, GM-CSF, GCSF, или их фрагмента или варианта, или комбинации из любых вышеуказанных цитокинов. В других вариантах осуществления цитокиновая молекула выбрана из интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23) или интерферона гамма, или их фрагмента или варианта, или комбинации из любых вышеуказанных цитокинов. Цитокиновая молекула может представлять собой мономер или димер.

[0071] В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен. В одном варианте осуществления цитокиновая молекула включает рецептор IL-15 или его фрагмент (например внеклеточный IL-15 домен связывания IL-15 рецептора альфа), как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например IL-15 или суперагонист IL-15, как описано здесь. В соответствии с используемым здесь значением, форма в виде "суперагониста" молекулы цитокина демонстрирует повышенную активность, например, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30% более высокую по сравнению со встречающимся в природных условиях цитокином. Примером суперагониста является IL-15 SA. В некоторых вариантах осуществления IL-15 SA включает комплекс IL-15 и связывающего фрагмента IL-15 рецептора IL-15, например рецептор альфа IL-15 или его связывающий IL-15 фрагмент, например как описано здесь.

[0072] В других вариантах осуществления цитокиновая молекула также включает молекулу антитела, например Fab и scFv фрагмент иммуноглобулина, Fab фрагмент, FAV₂ фрагмент, или фрагмент или производное антитела, например фрагмент sdAb

(нанотело), фрагмент антитела с тяжелой цепью, например Fc участок, однодоменное антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело). В одном варианте осуществления цитокиновая молекула также включает Fc или Fab иммуноглобулина.

[0073] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-2, например IL-2 или IL-2-Fc. В других вариантах осуществления в рамках описанных здесь способов и композиций может применяться агонист цитокина. В рамках вариантов осуществления агонист цитокина представляет собой агонист цитокинового рецептора, например молекулу антитела (например агонистное антитело) для цитокинового рецептора, которая обеспечивает, по меньшей мере, один вид активности встречающегося в природе цитокина. В рамках вариантов осуществления агонист цитокина представляет собой цитокиновый рецептор, например молекулу антитела (например агонистное антитело) для цитокинового рецептора, выбранного из IL-15Ra или IL-21R.

[0074] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например полноразмерную молекулу, фрагмент или вариант IL-15, например IL-15 человека. В рамках вариантов осуществления молекула IL-15 является относящейся к дикому типу IL-15 человека. В других вариантах осуществления молекула IL-15 представляет собой вариант IL-15 человека, например имеющий один или несколько аминокислотных модификаций. В некоторых вариантах осуществления молекула IL-15 включает мутацию, например точечную мутацию N72D.

[0075] В рамках других вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например внеклеточный домен IL-15R альфа, необязательно связанный с Fc иммуноглобулина или молекулой антитела. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой суперагонист IL-15 (IL-15SA), как описано в WO 2010/059253. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает IL-15 и домен рецептора альфа растворимого IL-15, слитый с Fc (например слитый белок sIL-15Ra-Fc), например как описано у Rubinstein et al *PNAS* 103:24 p. 9166-9171 (2006).

[0076] Молекула IL-15 может также включать полипептид, например цитокиновый рецептор, например домен цитокинового рецептора, и второй являющийся гетерологичным домен. В одном варианте осуществления гетерологичный домен представляет собой Fc участок иммуноглобулина. В других вариантах осуществления

гетерологичный домен представляет собой молекулу антитела, например фрагмент Fab, фрагмент Fab₂, фрагмент scFv, или фрагмент или производное антитела, например фрагмент sdAb (нанотело), фрагмент антитела с тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления полипептид также включает третий гетерологичный домен. В некоторых вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой N-конец второго домена, а в других вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой C-конец второго домена.

[0077] Определенные цитокины и антитела описаны, например, в публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944, публикации заявки на патент США 2014/0081012, и РСТ заявке РСТ/US2017/037249 (каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки).

Контейнеры

[0078] В некоторых вариантах осуществления контейнеры или наночастицы могут быть получены путем поперечного сшивания различных терапевтических белковых мономеров с применением одного или нескольких описанных здесь поперечносшивающих линкеров. В то время как на фигуре показан содержащий дисульфид линкер, могут применяться и другие описанные здесь биорасщепляемые линкеры.

[0079] В определенных вариантах осуществления контейнеры могут быть получены путем реакции нескольких терапевтических белковых мономеров с несколькими поперечносшивающими линкерами с образованием белковых кластеров, имеющих размер, например от около 30 нм до 1000 нм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления данная реакция может быть осуществлена при температуре от около 5 °С до около 40 °С. Реакция может быть осуществлена в течение от около 1 минуты до около 8 часов.

[0080] Белковые кластеры могут иметь модификацию поверхности, такую как поликатион. Определенные виды модификации поверхности описаны в публикации заявки на патент США 2017/0080104 и патенте США 9603944, полностью приведенных здесь в качестве ссылки. Примеры включают полилизин (polyK), ПЭГ-polyK и полиаргинин.

[0081] В некоторых вариантах осуществления реакция поперечного сшивания может происходить в присутствии одного или нескольких краудинг-агентов, таких как

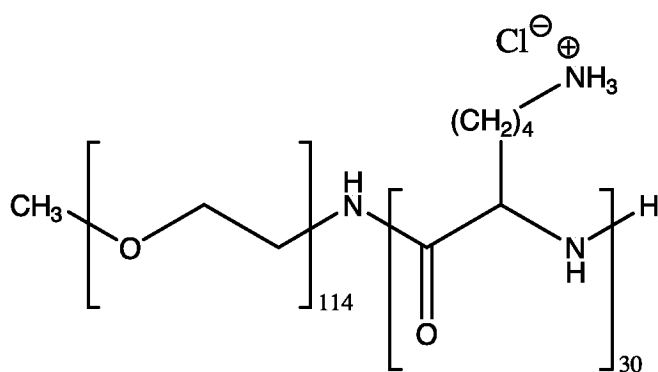
полиэтиленгликоль (ПЭГ) и триглицериды. Примеры ПЭГ включают ПЭГ-400, ПЭГ-1000, ПЭГ-1500, ПЭГ-2000, ПЭГ-3000 и ПЭГ-4000.

[0082] Определенные средства для повышения растворимости белков, такие как глицерин, этиленгликоль и пропиленгликоль, сорбитол и маннитол, также могут повышать выход в плане образования контейнеров.

[0083] В определенных вариантах осуществления определенные поперечносшивающие линкеры согласно изобретению вследствие реакции катионных лизиновых остатков в контейнере будут приводить к получению контейнера, имеющего общий отрицательный заряд, который будет ингибировать присоединение к клеткам. Таким образом, может являться полезным сначала образовать комплекс в виде контейнеров с поликатионом путем электростатических взаимодействий для обеспечения присоединения к клеткам. Например, контейнеры могут быть покрыты или подвергнуты модификации поверхности в виде поликатиона, такого как полилизин (поли-L-лизин), полиэтиленимин, полиаргинин, полигистидин, полибрен и/или DEAE-декстран. Поликатион может помогать контейнерам неспецифически связываться или адсорбироваться на клеточных мембранах, которые являются отрицательно заряженными. В некоторых вариантах осуществления поликатион для смешанного раствора может представлять собой полимерное соединение, имеющее катионную группу или группу, которая может стать катионной группой, при этом водный раствор свободного поликатиона. Примеры группы, которая может стать катионной группой, включают аминогруппу, иминогруппу и им подобные. Примеры поликатиона включают: полиаминокислоту, такую как полилизин, полиорнитин, полигистидин, полиаргинин, политриптофан, поли-2,4-диаминомасляную кислоту, поли-2,3-диаминопропионовую кислоту, протамин и полипептид, имеющий, по меньшей мере, один или несколько видов аминокислотных остатков в полипептидной цепи, выбранных из группы, состоящей из лизина, гистидина, аргинина, триптофана, орнитина, 2,4-диаминомасляной кислоты и 2,3-диаминопропионовой кислоты; полиамин, такой как полиаллиламин, поливиниламин, сополимер аллиламина и диаллиламина, и полидиаллиламин; и полиимин, такой как полиэтиленимин.

[0084] В некоторых вариантах осуществления покрытие или модифицирующий поверхность агент в виде поликатиона, применяемый для промотирования адгезии контейнеров к клеткам, представляет собой катионный блок-сополимер ПЭГ-полилизина, такой как [метокси-поли(этиленгликоль)*n*-блок-поли(L-гидрохлорид

лизина), ПЭГ-полилизин] (РК30). Данный блок-сополимер может содержать приблизительно 114 единиц ПЭГ (молекулярная масса приблизительно 5000 Да) и 30 единиц лизина (молекулярная масса приблизительно 4900 Да). Линейный ПЭГ полимер имеет метокси-концевую группу, при этом полилизины присутствуют в форме гидрохлоридной соли. РК30 представляет собой линейный амфифильный блок-сополимер, который имеет блок поли(гидрохлорид L-лизина) и неактивный ПЭГ блок. Поли-L-лизиновый блок обеспечивает общий катионный заряд при физиологическом уровне pH и придает контейнеру общий положительный заряд после ассоциации. Структура РК30 [метокси-поли(этиленгликоль)_n-блок-поли(L-гидрохлорид лизина)] является следующей.



[0085] В некоторых вариантах осуществления контейнеры могут быть покрыты антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с рецептором на поверхности иммунной клетки, при этом обеспечивая специфичное нацеливание контейнеров на иммунные клетки. Примеры антител включают те, которые описаны здесь, или содержащие их слитые белки.

[0086] В одном примере мономеры "IL15-Fc" (IL15Ra-sushi домен-Fc-слитый гомодимерный белок с двумя связанными белками IL-15) могут быть поперечно сшиты и подвергнуты модификации поверхности с помощью поликатиона для образования контейнеров IL-15. Данные контейнеры IL-15 затем могут быть нагружены на иммунные клетки, такие как Т-клетки, для получения подвергнутых праймингу Т-клеток.

IFM

[0087] В некоторых вариантах осуществления цитокины или другие иммуномодуляторы могут нацеливаться на рецепторы (например на иммунной клетке) с помощью IFM, например описанных в РСТ заявках РСТ/US2018/040777,

PCT/US18/40783 и PCT/US18/40786 (каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки).

[0088] В определенных вариантах осуществления IFM может быть выражена с помощью следующей формулы в рамках ориентации от N к C концу: R1-(необязательно L1)-R2 или R2-(необязательно L1)-R1; при этом R1 включает часть для нацеливания иммунной клетки, L1 включает линкер (например описанный здесь пептидный линкер), а R2 включает иммуностимулирующую часть, например молекулу цитокина.

[0089] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая часть, например молекула цитокина, соединена, например ковалентно соединена, с частью для нацеливания иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая часть, например молекула цитокина, функционально соединена, например ковалентно соединена (например с помощью химической связи, слияния, нековалентной связи или иным образом) с частью для нацеливания иммунной клетки. Например, иммуностимулирующая часть может быть ковалентно соединена непрямым образом, например через линкер, с частью для нацеливания иммунной клетки.

[0090] В рамках вариантов осуществления данный линкер выбран из: расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, пептидного линкера, гибкого линкера, жесткого линкера, спирального линкера или неспирального линкера. В некоторых вариантах осуществления данный линкер представляет собой пептидный линкер. Пептидный линкер может иметь длину 5-20, 8-18, 10-15, или около 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает Gly и Ser, например линкер включает аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)_n, при этом n обозначает количество повторов мотива, например n=1, 2, 3, 4 или 5 (например (Gly₄Ser)₂ или (Gly₄Ser)₃ линкер).

[0091] В других вариантах осуществления линкер представляет собой непептидный химический линкер. Например иммуностимулирующая часть может быть ковалентно соединена с частью для нацеливания иммунной клетки с помощью поперечного сшивания. Подходящие поперечносшивающие линкеры включают линкеры, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отличных в плане реактивности группы, разделенные подходящим спейсером (например, сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид) или гомобифункциональными

(например, дисукцинимидилсуберат).

[0092] В некоторых вариантах осуществления данный линкер может представлять собой биоразлагаемый или расщепляемый линкер. Расщепляемый линкер обеспечивает расщепление IFM, так что иммуностимулирующая часть, например молекула цитокина, может быть высвобождена из части для нацеливания иммунной клетки. Расщепление линкера может быть вызвано с помощью биологической активации в соответствующей ткани или, в качестве альтернативы, с помощью внешних стимулов, таких как, например электромагнитное облучение, например УФ-облучение.

[0093] В одном варианте осуществления расщепляемый линкер может обеспечивать расщепление на поверхности клетки, например расщепление в условиях, связанных с повреждением клетки или заболеванием ткани. Подобные условия включают, например, ацидоз; наличие внутриклеточных ферментов (которые в нормальных условиях заключены внутри клеток), включая некротические состояния (например, расщепление кальпаинами или другими протеазами, которые выделяются из некротических клеток); связанные с гипоксией условия, такие как восстанавливающая среда; тромбоз (например линкер может расщепляться тромбином или другим ферментом, связанным с каскадом образования кровяных сгустков); активацию иммунной системы (например линкер может расщепляться вследствие действия активированного комплементарного белка); или другое состояние, связанное с заболеванием или травмой.

[0094] В одном варианте осуществления расщепляемый линкер может включать связь S-S (дисульфидную связь) или может включать комплекс переходного металла, который разрушается при восстановлении металла. Один вариант осуществления S-S линкера может иметь следующую структуру (как описано в патенте США 9603944, который полностью приведен здесь в качестве ссылки).

[0095] Другой пример чувствительных к pH линкеров, которые расщепляются при изменении pH, например при низком pH, которые будут обеспечивать гидролиз лабильных по отношению к кислотам (или основаниям) групп, например кислотолабильных сложноэфирных групп и так далее. Подобные условия могут присутствовать в рамках внеклеточной среды, например кислотные условия, которые могут присутствовать рядом с раковыми клетками и тканями, или щелочная среда, которая присутствует рядом с гипоксическими или ишемическими клетками или

тканями; вследствие протеаз или других ферментов, располагаемых на поверхности клеток или высвобождающихся рядом с клетками, связанными с подвергаемым лечению состоянием, таких как подвергнутые заболеванию, апоптотические или некротические клетки и ткани; или вследствие других состояний или факторов. Лабильный по отношению к кислотам линкер может представлять собой, например, линкер на основе цис-аконитовой кислоты. Другие примеры чувствительных к pH линкеров включают ацетали, кетали, активированные амиды, такие как амиды 2,3-диметилмалеамовой кислоты, простой виниловый эфир, другие активированные простые и сложные эфиры, такие как енольные или силиловые простые эфиры или сложные эфиры, имины, иминии, ортоэфиры, енамины, карбаматы, гидразоны и другие связи, известные в этой области (см., например, публикацию РСТ заявки WO 2012/155920 и Franco et al. AIMS Materials Science, 3(1): 289-323, которые приведены здесь в качестве ссылки). Также могут применяться линкеры, описанные в WO 2019/050977, которая приведена здесь для ссылки. Выражение "чувствительный к pH" обозначает факт, который заключается в том, что рассматриваемый расщепляемый линкер по существу расщепляется при кислом pH (например pH ниже 6,0, например в диапазоне 4,0-6,0).

[0096] В других вариантах осуществления иммуностимулирующая часть напрямую ковалентно связана с частью для нацеливания иммунной клетки без линкера.

[0097] В других вариантах осуществления иммуностимулирующая часть и часть для нацеливания иммунной клетки IFM не являются ковалентно связанными, например являются связанными нековалентно.

[0098] Примеры форматов слияния молекулы цитокина с молекулой антитела, например частью иммуноглобулина (Ig), например антителом (IgG) или фрагментом антитела (Fab, scFv и им подобным) могут включать продукт слияния с amino-концом (N-концом) или карбокси-концом (C-концом) молекулы антитела, обычно C-концом молекулы антитела. В одном варианте осуществления молекула в виде слитого цитокина-части Ig, включающая цитокиновый полипептид, комплекс цитокин-рецептор или комплекс цитокин-Fc рецептор, присоединенный к полипептиду Ig, подходящую связь между цепью полипептида цитокина и цепью полипептида Ig, включает прямую полипептидную связь, связь с полипептидным линкером между данными двумя цепями и химическую связь между данными цепями.

[0099] В одном примере IFM содержит интерлейкин-12 (IL-12). В целом IL-12

представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из субъединиц p35 и p40, которые кодируются 2 отдельными генами: IL-12A и IL-12B, соответственно. IL-12 принимает участие в дифференциации наивных Т-клеток в Th1-клетки. Он известен как стимулирующий Т-клетки фактор, который может стимулировать рост и функцию Т-клеток. Он стимулирует продуцирование интерферона-гамма (IFN- γ) и фактора-альфа некроза опухоли (TNF- α) из Т-клеток и естественных киллерных клеток (NK-клеток) и снижает опосредованную IL-4 супрессию IFN- γ . Т-клетки, которые продуцируют IL-12, имеют корецептор CD30, который связан с активностью IL-12.

[00100] IL-12 играет важную роль в плане активности NK-клеток и Т-лимфоцитов. IL-12 опосредует стимулирование цитотоксической активности NK-клеток и CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов. Похоже, что также существует связь между IL-2 и сигнальной трансдукцией IL-12 в NK-клетках. IL-2 стимулирует экспрессию двух рецепторов IL-12: IL-12R- β 1 и IL-12R- β 2, поддерживающих экспрессию критического белка, участвующего в передаче сигнала IL-12 в NK-клетках. Подвергнутый стимулированию функциональный ответ выражается в виде продуцирования IFN- γ и гибели клеток-мишеней.

[00101] IL-12 также обладает антиангиогенной активностью, что означает, что он может блокировать образование новых кровяных сосудов. Он обеспечивает это благодаря повышению продуцирования интерферона гамма, который в свою очередь повышает продуцирование хемокина, называемого индуцированным белком-10 (IP-10 или CXCL10). IP-10 затем опосредует данный антиангиогенный эффект. В связи с его способностью индуцировать иммунные ответы и его антиангиогенной активностью существовал интерес с отношении тестирования IL-12 в качестве положительного противоракового лекарства. Существует связь между IL-12 и псориазом и воспалительным заболеванием кишечника, которая может являться полезной при лечении.

[00102] IL-12 связывается с рецептором IL-12, который представляет собой гетеродимерный рецептор, образованный IL-12R- β 1 и IL-12R- β 2. Считается, что IL-12R- β 2 играет ключевую роль в плане функционирования IL-12, поскольку он присутствует на активированных Т-клетках и стимулируется цитокинами, которые промотируют развитие Th1-клеток, и ингибируется цитокинами, которые промотируют развитие Th2-клеток. При связывании IL-12R- β 2 фосфорилируется по тирозину и обеспечивает наличие участков связывания для киназ Tyk2 и Jak2. Они являются

важными в плане активации критических белков-факторов транскрипции, таких как STAT4, которые участвуют в передаче сигнала IL-12 в Т-клетках и NK-клетках.

[00103] IL-12 является сильным цитокином, который потенциально может модифицировать противовоспалительную среду в солидных опухолях. Тем не менее, его клиническое применение было ограничено вследствие серьезной токсичности как при введении в растворимом виде, так и с помощью адаптивно перенесенных Т-клеток, являющихся модифицированными для секретирования IL-12. Описанный здесь связанный продукт слияния (TF) обеспечивает улучшенный контроль в плане дозировки и биораспределения цитокинов. В рамках систем на основе *in vitro* моделей цитокин IL-12-TF обеспечивает стабильную нагрузку IL-12 на поверхность Т-клеток и устойчивую активацию Т-клеток и передачу сигнала ниже рецепторов IL-12. В свою очередь, это может обеспечивать активацию врожденного и приобретенного иммунитета.

[00104] IL-12 в рамках связанного продукта слияния может присутствовать в форме одиночной цепи, содержащей как IL-12A, так и IL-12B субъединицы. В некоторых вариантах осуществления IL-12 может присутствовать в виде неодионой цепи (то есть в виде гетеродимера IL-12A и IL-12B, который представляет собой природную форму IL-12). Например, TF может быть получен путем совместной экспрессии трех субъединиц белка (тяжелой цепи Fab, легкой цепи Fab с IL-12A (или IL-12B) и IL-12B (или IL-12A)).

[00105] В некоторых вариантах осуществления TF может представлять собой IL-12-TF, такой как IL-12, слитый с антителом против CD45, как описано в международной РСТ публикации WO 2019/010219, полностью приведенной здесь в качестве ссылки. В рамках одного примера TF в виде "IL-12 DEEP™" (одноцепочечный IL-12p70, слитый с гуманизированным Fab против CD45) может быть рекомбинантно экспрессирован, очищен и затем связан с иммунными клетками, экспрессирующими CD45, такими как Т-клетки, для получения подвергнутых праймингу Т-клеток.

Композиции и клеточная терапия

[00106] В некоторых вариантах осуществления после получения и очистки контейнеры могут быть необязательно заморожены до применения в рамках клеточной терапии. Клеточная терапия может быть выбрана, например, из адаптивной клеточной

терапии, терапии на основе CAR-T-клеток, терапии на основе модифицированных TCR T-клеток, терапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, терапии на основе обученных против антигена T-клеток или терапии на основе обогащенных антиген-специфичных T-клеток.

[00107] В рамках различных вариантов осуществления композиция для клеточной терапии может быть получена путем получения описанного здесь белкового кластера или контейнера или композиции на основе связанного продукта слияния и инкубирования белкового кластера или контейнера или композиции на основе связанного продукта слияния с ядродержащими клетками, такими как иммунные клетки, предпочтительно в течение около 30-60 минут. Данные клетки могут быть заморожены с контейнерами до введения пациенту с помощью, например, инфузии.

[00108] Также здесь описана композиция для клеточной терапии, включающая описанный здесь белковый кластер или контейнер или композицию на основе связанного продукта слияния, связанную с ядродержащей клеткой, такой как T-клетки и NK-клетки. Подобная композиция для клеточной терапии может быть введена нуждающемуся в этом субъекту. При введении поперечносшивающие линкеры в контейнерах могут расщепляться вследствие физиологических условий с высвобождением терапевтических белковых мономеров из белкового кластера.

[00109] Здесь описаны композиции, включая фармацевтические композиции, включающие контейнеры или связанные продукты слияния. Композиция может быть составлена в рамках фармацевтически приемлемых количеств в виде фармацевтически приемлемых композиций. Термин "фармацевтически приемлемый" означает нетоксичный материал, который не оказывает негативного влияния на эффективность биологической активности активных ингредиентов (например биологически активных белков наночастиц). В рамках некоторых вариантов осуществления подобные композиции могут содержать соли, буферирующие агенты, консерванты и необязательно другие терапевтические агенты. В рамках некоторых вариантов осуществления фармацевтические композиции также могут содержать подходящие консерванты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут присутствовать в единичной лекарственной форме и могут быть получены с помощью любых способов, которые хорошо известны в области фармакологии. В рамках некоторых вариантов осуществления фармацевтические композиции, являющиеся подходящими для парентерального введения, включают стерильные

водные или неводные препараты на основе наночастиц, которые в рамках некоторых вариантов осуществления являются изотоническими по отношению к крови субъекта-реципиента. Данный препарат может быть составлен в соответствии с известными способами. Стерильный инъеклируемый препарат также может представлять собой стерильный инъеклируемый раствор или суспензию в нетоксичном парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе.

[00110] Описанные здесь композиции имеют множество вариантов терапевтического применения, включая, например, лечение рака, аутоиммунных заболеваний и инфекционных заболеваний. Описанные здесь способы включают лечение рака у субъекта с помощью контейнеров или снабженных контейнерами клеток, как описано здесь. Также предусмотрены способы снижения или облегчения симптома рака у субъекта, а также способы ингибирования роста рака и/или уничтожения одной или нескольких раковых клеток. В рамках вариантов осуществления описанные здесь способы снижают размер опухоли и/или понижают количество раковых клеток у субъекта, которому вводят описанный здесь или описанную здесь фармацевтическую композицию.

[00111] В рамках вариантов осуществления рак представляет собой гематологический рак. В рамках вариантов осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. В соответствии с используемым здесь значением, термин "гематологический рак" обозначает опухоль гемопоэтических или лимфоидных тканей, например опухоль, которая затрагивает кровь, костный мозг или лимфатические узлы. Примеры гематологических злокачественных новообразований включают, но без ограничения, лейкоз (например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), волосатоклеточный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз (AMoL), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML) или крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз), лимфому (например, лимфому, связанная со СПИДом, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина (например, классическую лимфому Ходжкина или лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов), грибовидный микоз, неходжкинскую лимфому (например, В-клеточную неходжкинскую лимфому (например, лимфому Беркитта, малую лимфоцитарную лимфому (CLL / SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную

лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, предшественник В-лимфобластной лимфомы, или мантийноклеточную лимфому) или Т-клеточную неходжкинскую лимфому (грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, или предшественник Т-лимфобластной лимфомы)), первичную лимфому центральной нервной системы, синдром Сезари, макроглобулинемию Вальденстрема), хроническое миелопролиферативное новообразование, гистиоцитоз клеток Лангерганса, множественную миелому / новообразование плазматических клеток, миелодиспластический синдром или миелодиспластическое/миелопролиферативное новообразование.

[00112] В рамках вариантов осуществления рак представляет собой солидный рак. Примеры солидного рака включают, но без ограничения, рак яичника, рак прямой кишки, рак желудка, рак яичка, рак анальной области, рак матки, рак толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак печени, немелкоклеточную карциному легкого, рак тонкой кишки, рак пищевода, меланому, саркому Капоши, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак шейки матки, карциному маточных труб, карциному эндометрия, карциному влагалища, саркому мягких тканей, рак уретры, рак вульвы, рак полового члена, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль оси позвоночника, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичная лимфома ЦНС, опухолевый ангиогенез, метастатические поражения при указанных видах рака или их комбинации.

[00113] В рамках вариантов осуществления контейнеры или снабженные контейнером клетки вводят с помощью способа, являющегося подходящим в плане подвергнутого лечению или предотвращению заболевания. Количество и частота введения будут определены на основе таких факторов, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента. Подходящие дозировки могут быть определены с помощью клинических испытаний. Например при указании в виде "эффективного количества" или "терапевтического количества" конкретное количество фармацевтической композиции (или контейнеров) для введения может быть определено лечащим врачом с учетом индивидуальных различий в плане размера

опухоли, тяжести инфекции или метастазов, возраста, веса и состояния субъекта. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена в дозировке от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, например от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в рамках данных диапазонов. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена несколько раз при указанных дозировках. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена с помощью способов на основе инфузии, описанных в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

[00114] В рамках вариантов осуществления контейнеры или снабженные контейнером клетки вводят пациенту парентерально. В рамках вариантов осуществления клетки вводят субъекту внутривенно, подкожно, внутриопухолевым способом (внутри опухоли), интранодально (внутри узлов), внутримышечно, внутрикожно или внутрибрюшинно. В рамках вариантов осуществления клетки вводят, например инъецируют, напрямую в опухоль или лимфатический узел. В рамках вариантов осуществления клетки вводят в виде инфузии (например как описано у Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988) или с помощью внутривенного введения. В рамках вариантов осуществления клетки вводят в виде инъецируемой депо-композиции.

[00115] В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой человека, обезьяну, свинью, собаку, кошку, корову, овцу, козу, кролика, крысу или мышь. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой субъекта-ребенка, например в возрасте менее 18 лет, например в возрасте менее 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 лет или менее. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой взрослого, например в возрасте, по меньшей мере, 18 лет, например в возрасте, по меньшей мере, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 или 80-90 лет.

Ингибиторы контрольных точек и их ингибитор

[00116] Способность Т-клеток опосредовать иммунный ответ против антигена требует двух различных сигнальных взаимодействий (Viglietta, V. et al. (2007)

Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A. J. et al. (2007) Adv. Immunol. 90:297-339). Сначала антиген, который был расположен на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC), презентуется антиген-специфичной наивной CD4⁺ Т-клетке. Подобное презентирование обеспечивает доставку сигнала через Т-клеточный рецептор, который направляет Т-клетку для инициирования иммунного ответа, являющегося специфичным в плане презентированного антигена. Далее различные костимулирующие и ингибиторные сигналы, опосредованные путем взаимодействий между APC и отдельными молекулами на поверхности Т-клеток, запускают активацию и пролиферацию Т-клеток и в конечном счете их ингибирование.

[00117] Иммунная система тщательно контролируется сетью костимулирующих и коингибирующих лигандов и рецепторов. Данные молекулы обеспечивают передачу второго сигнала для активации Т-клеток и обеспечивают сбалансированную сеть положительных и отрицательных сигналов для максимизации иммунных ответов против инфекции, в то же время ограничивая аутоиммунитет (Wang, L. et al. (Epub Mar. 7, 2011) J. Exp. Med. 208(3):577-92; Lepenies, B. et al. (2008) Endocrine, Metabolic & Immune Disorders- Drug Targets 8:279-288). Примеры костимулирующих сигналов включают связывание между B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86) лигандами APC и CD28 и CTLA-4 рецепторами CD4 Т-лимфоцита (Sharpe, A. H. et al. (2002) Nature Rev. Immunol. 2: 116-126; Lindley, P. S. et al. (2009) Immunol. Rev. 229:307-321). Связывание B7.1 или B7.2 с CD28 стимулирует активацию Т-клеток, при этом связывание B7.1 или B7.2 с CTLA-4 ингибирует подобную активацию (Dong, C. et al. (2003) Immunolog. Res. 28(1):39-48; Greenwald, R. J. et al. (2005) Ann. Rev. Immunol. 23:515- 548). CD28 в основном экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., et al. (1992) J. Immunol. 149:380-388), в то время как экспрессия CTLA-4 быстро повышается после активации Т-клеток (Linsley, P. et al. (1996) Immunity 4:535-543).

[00118] Другие лиганды рецептора CD28 включают группу родственных B7 молекул, также известных как "суперсемейство B7" (Coyle, A. J. et al. (2001) Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A. H. et al. (2002) Nature Rev. Immunol. 2: 116-126; Collins, M. et al. (2005) Genome Biol. 6:223.1- 223.7; Korman, A. J. et al. (2007) Adv. Immunol. 90:297-339). Известно несколько членов Суперсемейства B7, включая B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), лиганд программируемой смерти-1 (PD-L1; B7-H1), лиганд программируемой смерти-2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 и B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) Genome Biol. 6:223.1-

223.7).

[00119] Белок программируемой смерти-1 (PD-1) представляет собой ингибиторный член расширенного CD28/CTLA-4 семейства Т-клеточных регуляторов (Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) *J. Immunol.* 170:711-8). Другие члены семейства CD28 включают CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. Были идентифицированы два гликопротеиновых лиганда клеточной поверхности для PD-1: лиганд программируемой смерти-1 (PD-L1) и лиганд программируемой смерти-2 (PD-L2). Было показано, что PD-L1 и PD-L2 снижают активацию Т-клеток и секретирование цитокинов при связывании с PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11 :2947-53).

[00120] PD-L1 (также известный как кластер дифференциации 274 (CD274) или B7 гомолог-1 (B7-H1)) представляет собой 40 кДа трансмембранный белок типа 1. PD-L1 связывается со своим рецептором, PD-1, располагающимся на активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках, для модулирования активации или ингибирования. Как PD-L1, так и PD-L2 представляют собой гомологи B7, которые связываются с PD-1, но не связываются с CD28 или CTLA-4 (Blank et al. (2005) *Cancer Immunol Immunother.* 54:307-14). Связывание PD-L1 со своим рецептором PD-1 на Т-клетках обеспечивает передачу сигнала, который ингибирует TCR-опосредованную активацию продуцирования IL-2 и пролиферации Т-клеток. Данный механизм включает ингибирование фосфорилирования ZAP70 и его связывания с CD3C (Sheppard et al. (2004) *FEB S Lett.* 574:37-41). Передача сигнала PD-1 снижает фосфорилирование петли активации PKC- Θ , возникающее вследствие передачи сигнала TCR, что является необходимым для активации факторов транскрипции NF- κ B и AP-1, а также для продуцирования IL-2. PD-L1 также связывается с костимулирующей молекулой CD80 (B7-1), но не CD86 (B7-2) (Butte et al. (2008) *Mol Immunol.* 45:3567-72).

[00121] Было также показано, что экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности повышается за счет стимулирования IFN- γ . Экспрессия PD-L1 была обнаружена при многих видах рака, включая рак легкого человека, карциному яичника и толстой кишки, и различные виды миеломы, при этом она часто ассоциирована с плохим прогнозом (Iwai et al. (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11 :2947-53; Okazaki et al. (2007) *Intern. Immun.* 19:813-24; Thompson et al. (2006) *Cancer*

Res. 66:3381-5). Было предположено, что PD-L1 играет определенную роль в выработке противоопухолевого иммунного ответа путем повышения уровня апоптоза антигенспецифичных Т-клеточных клонов (Dong et al. (2002) Nat Med 8:793-800). Было также предположено, что PD-L1 может участвовать в развитии воспаления слизистой оболочки тонкой кишки, при этом ингибирование PD-L1 приводит к подавлению кахексии, ассоциированной с колитом (Kanai et al. (2003) J Immunol 171:4156-63).

[00122] В некоторых вариантах осуществления описанная здесь композиция или иммунотерапия рака включает антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, атезолизумаб и другие антитела против PD-L1 описаны в патенте США 8217149, который полностью включен здесь в качестве ссылки. Авелумаб и другие антитела против PD-L1 описаны в заявке WO 2013/079174, которая полностью включена здесь в качестве ссылки. Дурвалумаб и другие антитела против PD-L1 описаны в патенте США 8779108, который полностью включен здесь в качестве ссылки. BMS-936559 и другие антитела против PD-L1 описаны в патенте США 7943743 и заявке WO 2015/081158, которые полностью включены здесь в качестве ссылки. Другие антитела против PD-L1 включают антитела, описанные, например, в WO 2015/181342, WO 2014/100079, WO 2016/000619, WO 2014/022758, WO 2014/055897, WO 2015/061668, WO 2013/079174, WO 2012/145493, WO 2015/112805, WO 2015/109124, WO 2015/195163, патенте США 8168179, патенте США 8552154, патенте США 8460927, и патенте США 9175082, которые полностью включены здесь в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Соединение иммунных клеток с контейнерами

[00123] **Цель:** Клетки человека (например Т-клетки, CAR-T, НК-клетки, другие иммунные клетки) могут быть помечены с помощью 5 концентраций IL-15 контейнера в HBSS при концентрации клеток 50 М/мл. После мечения клетки могут быть протестированы на:

- a. Жизнеспособность путем окрашивания 7-AAD и измерения с помощью FACS
- b. Экспансию в культуре с помощью шариков для подсчета клеток с измерением с помощью FACS
- c. Мечение поверхности контейнерами с помощью антител против IL-15 и антител против IgG человека

[00124] Следует отметить, что в то время как в рамках данного Примера используется IL-15, специалисту в данной области будет очевидно, что та же экспериментальная процедура является применимой и для других цитокинов и/или IFN.

Размораживание IL-15 контейнеров:

[00125] Контейнеры должны храниться при температуре -80 °C перед использованием. Размороженные контейнеры могут быть подвергнуты повторной заморозке и повторно использованы в рамках вплоть до 3 или более циклов заморозки/размораживания.

[00126] Взять аликвоты контейнеров из морозильника и разморозить их на льду.

1. После размораживания раствора с контейнерами оставить его для нагревания до комнатной температуры за 15 минут перед началом экспериментов по мечению клеток.
2. Довести исходный раствор контейнеров до конечного рабочего раствора с концентрацией 3 мг/мл с помощью HBSS.

	[контейнеры] концентрация исходного раствора (мг/мл)	[контейнеры] концентрация рабочего раствора (мг/мл)	Необходимый объем контейнеров (мкл)	Необходимый объем HBBS (мкл)	Общий объем рабочего раствора контейнеров (мкл)
СУТ15	4,2	3	100	40	140

Разбавление контейнеров и мечение клеток:

[00127] всего 7 реакций: одна с контролем в виде только PBS, одна с константным контролем в виде растворимого IL-15, добавляемого к клеткам после нанесения на планшеты, и пять образцов контейнеров с трехкратным повторением (всего 21 образец) Образцы контейнеров:

- a. Контейнер – Доза 1: 3 мг/мл
 - b. Контейнер – Доза 2: 1,5 мг/мл
 - c. Контейнер – Доза 3: 0,75 мг/мл
 - d. Контейнер – Доза 4: 0,375 мг/мл
 - e. Контейнер – Доза 5: 0,1875 мг/мл
1. Сделать последовательные разбавления контейнеров в 96-луночном планшете с круглым дном:

Дозировка контейнеров	Концентрация	Объем HBSS (>3х)	Объем предыдущей дозы (>3х)
Доза 1	3 мг/мл	нет	60 мкл исх. раствора
Доза 2	1.5 мг/мл	60 мкл	60 мкл исх. раствора
Доза 3	0,75 мг/мл	60 мкл	60 мкл Дозы 2
Доза 4	0,375 мг/мл	60 мкл	60 мкл Дозы 3
Доза 5	0,1875 мг/мл	60 мкл	60 мкл Дозы 4
Контроль в виде PBS	0	60 мкл	нет
Контроль в виде растворимого IL-15	0	60 мкл	нет

2. Распределить 10 мкл разбавленных контейнеров из каждой лунки, как описано выше, в три лунки в 96-луночной планшете с круглым дном (трехкратное присоединение контейнеров) – всего 21 лунка.

Промывание клеток и соединение с контейнерами:

[00128] Буферы, PBS и среды, используемые в рамках описанных ниже этапов, должны быть предварительно нагреты до 37°C.

1. Собрать 30×10^6 клеток из культуры и осадить их при 500 г в течение 5 минут
2. Удалить клеточный супернатант путем аспирации.
3. Промыть клетки путем ресуспендирования осадка в 10 мкл предварительно нагретого (37°C) HBSS буфера и произвести подсчет с помощью Cellometer (с красителем AOPI) или трипанового синего.
4. Центрифугировать при 500 г в течение 5 минут.
5. Аспирировать супернатант и суспендировать клеточный осадок в предварительно нагретом (37°C) HBSS до концентрации 100×10^6 /мл клеток (приблизительно 300 мкл буфера).
6. Перенести пипеткой 10 мкл клеток в каждую лунку с контейнерами или HBSS и осторожно перемешать их с помощью пипетки.

Образцы	№ клеток	Объем клеток (мкл)	Объем контейнеров (мкл)	Конечная концентрация контейнеров	Объем HBSS (мкл)	Конечный объем (мкл)
---------	----------	--------------------	-------------------------	-----------------------------------	------------------	----------------------

				(мг/мл)		
Доза 1	1×10^6	10	10	1,5	0	20
Доза 2	1×10^6	10	10	0,75	0	20
Доза 3	1×10^6	10	10	0,375	0	20
Доза 4	1×10^6	10	10	0,188	0	20
Доза 5	1×10^6	10	10	0,094	0	20
PBS	1×10^6	10	0	0	10	20
Растворимый IL-15	1×10^6	10	0	0	10	20

7. Накрыть планшет микропленкой для предотвращения испарения и инкубировать в инкубаторе для клеточной культуры (обычно при 37°C с 5% CO₂ или наиболее подходящими условиями для культуры).
8. Инкубировать клетки в течение одного часа при 37°C.
9. Добавить 180 мкл предварительно разогретой полной клеточной среды (с сывороткой) в каждую лунку.
10. Осаждать клетки при 500 г в течение 5 минут и аспирировать среду с помощью вакуумного манифолда
11. Промыть клетки еще два раза 200 мкл полной среды, осадить клетки и аспирировать супернатант как на этапах 9 и 10.
12. После третьего промывания ресуспендировать клетки из каждого образца в 200 мкл полной среды. Клетки должны иметь плотность $\sim 5 \times 10^6$ клеток/мл и должны быть далее разбавлены 1:10 при нанесении на планшеты.
13. Разбавить клетки 1:10 путем переноса 20 мкл клеточной суспензии из 96-луночного планшета с U-образным дном в 96-луночный планшет для культивирования ткани с плоским дном и затем добавить 180 мкл клеточной среды (без добавленных цитокинов) для достижения конечной плотности в планшете 5×10^5 клеток/мл.
14. Повторить этап 13 три дополнительных раза в трех отдельных 96-луночных планшетах с плоским дном (всего 4 планшета: День 0, День 1, День 3, День X для разделения для будущих моментов времени)
15. Добавить мономеры растворимого IL-15 в лунки с константным контролем в виде растворимого IL-15 в каждом планшете.

Подсчет клеток и тестирование жизнеспособности:

[00129] Клетки подсчитывают с помощью 7-AAD и шариков для подсчета клеток CountBright на проточном цитометре.

1. В каждый момент времени следует взять 96-луночный планшет с плоским дном из инкубатора, ресуспендировать клетки в среде с помощью пипетки
2. Перенести 20 мкл раствора с клетками в 96-луночный планшет с V-образным дном
3. Добавить 20 мкл раствора "CountBright Bead Solution" в каждую лунку.

Раствор CountBright Bead Solution содержит (ниже перечислены объемы для мечения 1 лунки):

- a. 19,6 мкл исходных шариков CountBright
 - b. 0,4 мкл 100x 7AAD (7-AAD, LifeTech, A1310, 10 мкг/мл соответствует 100x)
4. Повторить данные этапы в день 1, 3 и X после культивирования для оценки жизнеспособности и экспансии.

Тестирование эффективности нагрузки контейнеров с помощью окрашивания поверхности

[00130] Анализируют поверхностные уровни IL-15 контейнеров с помощью проточной цитометрии в День 0 и День 1 с помощью антитела против IL-15 и антител против IgG человека.

1. Взять 96-луночный планшет с плоским дном из инкубатора, ресуспендировать клетки в среде с помощью пипетки
2. Перенести 100 мкл раствора клеток в новый 96-луночный планшет с V-образным дном (он должен содержать ~ 50000 клеток)
3. Осадить клетки (500 г в течение 5 минут) и аспирировать супернатант
4. Ресуспендировать клетки в 40 мкл раствора "Antibody Cell Surface Staining Solution" ("раствор для окрашивания поверхности клеток на основе антител")

Раствор для окрашивания на основе антител (ниже перечислены объемы для мечения 1 лунки):

- a. 0,4 мкл антитела мыши против IgG человека BV421 – Biolegend, кат. номер 409318, разбавление 1:100
- b. 0,4 мкл антитела против IL-15 PE: R&D Systems, кат. номер IC2471IP, разбавление 1:100

- c. 0,4 мкл 100х 7AAD (7-AAD, LifeTech, A1310, 10 мкг/мл соответствует 100х)
 - d. 38,8 мкл буфера MACS
5. Инкубировать клетки в течение 10 минут при комнатной температуре
 6. Добавить 160 мкл холодного буфера MACS в каждую лунку, осадить клетки при 500 г в течение 5 минут, аспирировать.
 7. Промыть клетки один дополнительный раз 200 мкл холодного буфера MACS
 8. Ресуспендировать в 30 мкл буфера MACS в расчете на одну лунку и анализировать с помощью проточного цитометра (режим HTS).

Используемые реагенты:

Сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS, Gibco, с кальцием и магнием, кат. номер 14025-092)

Фосфатный буферный солевой раствор (PBS, Gibco, без кальция, без магния, кат. номер 10010-023)

96-луночный планшет с круглым дном (Granier-Bio, чистый, стерильный, полипропиленовые планшеты, кат. номер 650261)

96-луночный планшет с v-образным дном (не обязательно, но рекомендуется): Costar 3894

96-луночный планшет с плоским дном (FisherSci, кат. номер 353072)

Шарики для подсчета клеток (LifeTech, CountBright Absolute Counting Beads, кат. номер C36950)

7-аминоактиномицин-D (7-AAD, LifeTech, кат. номер A1310)

IL-15 PE-конъюгированное антитело человека (R&D Systems, кат. номер IC2471P)

Антитело мыши против IgG человека, BV421 (Biolegend, кат. номер 409318)

Альтернативное антитело: антитело мыши против IgG человека, APC (Biolegend, кат. номер 409306)

Альтернативное антитело: антитело осла против IgG человека (H+L), DyLight 650 (ThermoFisher, кат. номер SA5-10129)

Буфер MACS (необязательно):

ЭДТА: LifeTechnologies, 15575-038

Фосфатно-буферный солевой раствор, pH 7,4 (такой же, как описано выше)

Альбумин коровьей сыворотки (BSA): AmericanBio, Inc. кат. номер AB01243-

Пример 2: Т-клетки, подвергнутые праймингу с применением IL-15 DEEP™, обеспечивают синергию при блокаде PD-L1 с преодолением резистентности к иммунотерапии вследствие контрольных точек

[00131] **Введение:** Итерлейкин-15 (IL-15) активирует и обеспечивает экспансию как CD8⁺ Т-клеток, так и NK-клеток, но не иммуносупрессорных T_{рег} клеток. Таким образом, IL-15 представляет собой привлекательный вариант в плане иммунотерапии рака, однако его систематическое введение ограничено вследствие иммунной активации и токсичности. Для ограничения системного влияния IL-15 авторы разработали IL-15 DEEP™, представляющий собой мультимер химически поперечно сшитых IL-15/IL-15 R α /Fc гетеродимеров (IL15-Fc). IL-15 DEEP™ нагружается в опухоль-реактивные Т-клетки перед адаптивным переносом клеток (АСТ). Данный новый терапевтический подход обеспечивает нагрузку IL-15 DEEP™ в клетки при концентрациях, которые являются недостижимыми в случае системного IL15-Fc, вызывает активацию и экспансию аутокринных Т-клеток, но в то же время ограничивает системное влияние и связанную с ним токсичность. Противоопухолевая активность терапии на основе Т-клеток была ограничена вследствие недостаточной экспансии Т-клеток и иммуносупрессии, вызванной контрольными точками. Здесь авторы совместили Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с блокадой PD-L1 для преодоления данных ограничений.

[00132] В частности, как показано на Фиг.1, DEEP™ IL-15 (или DP-15) обозначает мультимер IL15 рецептор α -sushi домен-Fc-слитых гомодимеров человека с двумя связанными молекулами IL-15 (IL15-Fc), соединенными расщепляемым поперечносшивающим линкером (см., например РСТ заявку РСТ/US2018/049594, приведенную здесь в качестве ссылки) и нековалентно покрытыми блок-сополимером полиэтиленгликоль (ПЭГ)-полилизин₃₀ (PK30). Более конкретно, IL-15 DEEP™ представляет собой мультимер мономеров IL15-Fc человека, соединенных гидролизуемым поперечносшивающим линкером (CL17) и нековалентно покрытых блок-сополимером полиэтиленгликоль (ПЭГ)-полилизин₃₀ (PK30). Мономеры IL15-Fc состоят из двух субъединиц, каждая из которых состоит из эффекторного ослабленного Fc варианта IgG2, слитого с IL15 рецептор α -sushi доменом, нековалентно связанным с молекулой IL-15. Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™,

получают с помощью процесса нагрузки, при котором клетки-мишени совместно инкубируются с IL-15 DEEP™ при высоких концентрациях. В рамках данного процесса IL-15 DEEP™ становится связанным с клеткой вследствие электростатических взаимодействий и усваивается с созданием внутриклеточных резервуаров с IL-15 DEEP™. Из данных резервуаров IL-15 DEEP™ медленно высвобождает биоактивные IL15-Fc вследствие гидролиза поперечносшивающего линкера. Данное замедленное высвобождение IL15-Fc стимулирует пролиферацию и выживаемость Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, что обеспечивает нацеленный, контролируемый и зависимый от времени иммунный стимул.

[00133] Целью данного исследования было оценить противоопухолевую активность PMEL клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, в комбинации с антителом против PD-L1 и оценить вклад циклофосфида (CPX) в противоопухолевую активность PMEL клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, самостоятельно или в комбинации с антителом против PD-L1.

Материалы и способы

Получение IL-15 DEEP™

[00134] IL-15 DEEP™ получали путем инкубирования IL15-Fc с обеспечивающим поперечное сшивание реагентом. PMEL CD8⁺ Т-клетки (PMEL) выделяли из B6.Cg-*Thy1^a*/Cy Tg(TcraTcrb)8Rest/J мышей, активировали, подвергали экспансии и нагружали IL-15 DEEP™ для получения PMEL, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™ (DEEP™-15 PMEL).

Животные

[00135] Самок B6D2F1 мышей (возрастом ~7 недель) приобретали у Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Масса тела составляла от 15,5 до 21,3 г в начале исследования. Уход и обращение с экспериментальными животными осуществлялись в соответствии с руководствами Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC).

Внесение опухолей B16-F10 и измерения опухолей и массы тела

[00136] Клетки меланомы B16-F10 (1×10^6) инъецировали подкожно в побритый

правый бок самок мышей B6D2F1 в День 5 исследования. Размеры опухолей (длину [L] и ширину [W], определенные в перечне аббревиатур) измеряли с помощью циркулей 3 раза в неделю. Объем опухолей подсчитывали с помощью формулы $(W^2 \times L)/2$. Для включения мышей случайным образом распределяли на основе объема опухолей (среднее значение 33,6 мм³, диапазон от 18 до 63 мм³). Животных отслеживали индивидуальным образом на предмет роста опухолей до Дня 76, при этом каждое животное умерщвляли при достижении или превышения объема опухолей 1500 мм³.

[00137] Лечение может вызвать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. В рамках ответа в виде PR объем опухолей составлял $\leq 50\%$ относительно объема в День 1 в рамках трех последовательных измерений в течение исследования и $\geq 13,5$ мм³ для одного или нескольких из данных трех измерений. В рамках ответа в виде CR объем опухолей составлял $\leq 13,5$ мм³ для трех последовательных измерений в рамках исследования. В рамках исследования животных оценивали на предмет события PR или CR только один раз, при этом CR определяли только при соблюдении критериев как PR, так и CR. Любое животное с ответом в виде CR в последний день исследования дополнительно классифицировали как не имеющее опухолей (TFS).

[00138] Животных взвешивали ежедневно в Дни 1-5, затем два раза в неделю до завершения исследования. Мышей подвергали частому наблюдению на предмет явных признаков каких-либо нежелательных связанных с лечением (TR) побочных эффектов, при этом записывали клинические признаки во время их наблюдения. Индивидуальные показатели массы тела (BW) отслеживали в соответствии с протоколом, при этом любое животное с потерей массы тела, превышающей 30% в рамках одного измерения или превышающего 25% в рамках трех последовательных измерений, умерщвляли с отнесением смерти к последствиям TR. Групповое среднее значение потери BW также отслеживали в соответствии с протоколом Charles River Discovery Services. Приемлемую токсичность определяли в виде группового среднего значения потери BW, соответствующего менее чем 20% потере в рамках исследования и не более чем 10% смертям вследствие TR.

Лимфодеплеция

[00139] Всем мышам инъецировали CPX в количестве 4 мг/мышь в День 1 для

деплеции эндогенных иммунных клеток.

Выделение и экспансия PMEL клеток

[00140] PMEL Т-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов (паховых, подмышечных и шейных) 30 самок PMEL мышей (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Селезенки и лимфатические узлы обрабатывали с помощью диссоциатора gentleMACS Octo (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) и пропускали через 40 мкм фильтр. Клетки промывали с помощью центрифугирования и очищали CD8a⁺ клетки с помощью набора для выделения IMACS для наивных CD8a⁺ клеток (Miltenyi Biotech) и блока MultiMACS Cell24 (Miltenyi Biotech) и сепаратора (Miltenyi Biotech) в соответствии с протоколом производителя. Чистоту CD8a⁺ клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии.

[00141] Всего выделяли приблизительно 533×10^6 PMEL Т-клеток и замораживали в среде CryoStor®CS10 (STEMCELL Technologies) при плотности 10×10^6 /мл/флакон. Приблизительно 200×10^6 клеток (20 флаконов) отправляли Charles River Discovery Services, 3300 Gateway Centre Blvd, Morrisville, NC 27560 для использования в рамках описанного здесь эксперимента. In vitro экспансия и нагрузка PMEL Т-клеток IL-15 DEEP™ осуществлялась в Charles River Discovery Services в качестве части исследования InVitro-e480. Замороженные CD8⁺ Т-клетки размораживали (День 0), ресуспендировали в $1,0 \times 10^6$ /мл среды 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), пенициллин/стрептомицин (Pen/Strep) (1%), L-глутамин (1%), инсулин/трансферрин/селен (ITS, 1%) и β-меркаптоэтанол (BME, 50 мкМ), и наносили на 6-луночные планшеты для культивирования ткани (5×10^6 клеток/луночка), покрытые антителами αCD3 и αCD28. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. IL-2 мыши (20 нг/мл) и IL-7 мыши (0,5 нг/мл) добавляли спустя 24 часа после нанесения на планшеты (День 1). В День 2 и День 3 клетки подсчитывали и разбавляли до концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл с помощью свежей среды, содержащей IL-21 мыши (25 нг/мл). Клетки собирали в День 4 и ресуспендировали при 100×10^6 PMEL Т-клеток/мл в инертном буфере.

Получение PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™

[00142] PMEL Т-клетки (100×10^6 клеток/мл) смешивали с равным объемом IL-15

DEEPTM (1,5 мг/мл) и инкубировали с вращением в течение 1 часа при 37°C с получением PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEPTM. PMEL Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, промывали (3 раза, сначала средой и затем дважды HBSS) с помощью центрифугирования (500 г) и подсчитывали. Затем клетки ресуспендировали при 25×10^6 клеток/мл, при этом мыши из Групп 5 и 7 получали 200 мкл клеточной суспензии (5×10^6 клеток) в/в в хвостовую вену.

Антитело α PD-L1

[00143] Антитело против PD-L1 приобретали у BioXcell (10F.9G2 клон) и хранили при 4 °C с защитой от света до использования.

Сбор крови

[00144] Прижизненные образцы крови (~0,1 мл) собирали от всех мышей во всех группах с помощью поднижнечелюстных кровотоков в День 3, День 6 и День 20 эксперимента (1, 4 и 18 дней после АСТ, соответственно). Образцы от мышей 1-5 обрабатывали для получения сыворотки без антикоагулянта и замораживали. Образцы от мышей 6-10 собирали в покрытых ЭДТА пробирках и обрабатывали для анализа с помощью проточной цитометрии (только образцы Дня 3 и Дня 6, не показаны).

Оценка комбинации PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, с антителом против PD-L1 у мышей с меланомой B16-F10

[00145] Разрабатывали эксперименты для оценки противоопухолевой активности PMEL клеток, нагруженных IL-15 DEEPTM, в комбинации с блокадой контрольных точек (антитело против PD-L1). Ход эксперимента показан на Фиг.3, 6 и 9 для исследования 1, 2 и 3, соответственно. Подробные способы для исследования 2 описаны здесь и являются аналогичными способам в рамках исследования 1 и 3, если иное не следует из Фиг.3 и 9. В частности, для исследования 1 инъецированные клетки соответствовали 10×10^6 , но не 5×10^6 (исследование 2), при этом антитело против PD-L1 самостоятельно отсутствовало, а контрольная группа представляла собой солевой раствор (данная группа не получала CPX). В рамках исследования 2 все группы получали CPX. В рамках исследования 3 использовали более крупные опухоли (~200-300 мм³), чем в рамках исследований 1 и 2 (ближе к 30-50 мм³).

Fc-IL-15 ELISA

[00146] Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) на основе Fc-IL-15 применяли для определения концентрации IL15-Fc в образцах сыворотки, собранных в День 3, День 6 и День 18. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4 °C антителом захвата козы против Fc IgG человека (Southern Biotech; 0,5 мкг/мл в фосфатном буферном солевом растворе, PBS). Затем планшеты промывали и блокировали реагентным разбавителем (1% альбумин коровьей сыворотки, BSA, в PBS) в течение, по меньшей мере, 2 часов при 30 °C. Планшеты промывали, в лунки добавляли образцы (разбавленные 1:20 в реагентном разбавителе) и стандарты на основе IL15-Fc (попарно, 31-2000 пг/мл, в реагентном разбавителе) и культивировали планшеты в течение 1 часа при 37 °C. Затем планшеты промывали и далее добавляли биотин-антитело против IL-15 для детектирования (R&D Systems; 0,125 мкг/мл в реагентном разбавителе) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем планшеты промывали, инкубировали со стрептавидином-HRP (Southern Biotech; 1/6000 в реагентном разбавителе) в течение 20 минут при 37°C, снова промывали и добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидиновый (TMB) субстратный раствор (Surmodics) и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте до остановки реакции с помощью 1N HCl (J. T. Baker). Затем планшеты сканировали на сканере для планшетов (450 нм).

[00147] Нижний предел количественного определения (LLOQ) в крови составлял 0,31 нг/мл для 1:20 разбавления.

Проточная цитометрия

[00148] Мышей умерщвляли спустя 7 дней после АСТ для анализа внутриопухолевых PMEL Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Опухоли диссоциировали в суспензии отдельных клеток и промывали окрашивающим буфером (0,5% BSA, 2 mM ЭДТА в PBS). Осажденные клетки ресуспендировали в исходной смеси (master mix), содержащей окрашивающие антитела, перечисленные ниже (разбавленные 1:100 в окрашивающем буфере) и шарики для подсчета клеток (Thermo Fisher, Waltham, MA), и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и защищали от света. Для внутриклеточного окрашивания клетки промывали 3X буфером для окрашивания, ресуспендировали в растворе для фиксации/повышения

проницаемости (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и инкубировали в течение ночи (4°C). На следующий день образцы центрифугировали, промывали 3X буфером для повышения проницаемости, инкубировали в течение 30 минут с антителами против внутриклеточного маркера Ki67 при комнатной температуре, защищали от света, и промывали один раз в буфере для повышения проницаемости и далее один раз промывали в буфере для окрашивания. Затем клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания для FACS анализа.

[00149] Данные в рамках проточной цитометрии собирали на FACSCelesta (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и анализировали в FlowJo v10.

Вид	Клеточный маркер	Флюорофор	Производитель	Кат. номер
Мышь	CD45	BV510	Biolegend	103138
Мышь	CD90.1	AF700	Biolegend	202528
Мышь	CD8a	APC-Cy7	Biolegend	100714
Мышь	CD4	BV711	Biolegend	100447
Мышь	PD1	BV785	Biolegend	135225
Мышь	CD39	PE-Cy7	Biolegend	143806
Мышь	TIm3	APC	Biolegend	134008
Мышь	Lag3	PerCP-Cy5.5	Biogened	125212
Мышь	ClCas3	488	R&D	IC835G-100
Мышь	IFN-g	PE	Biolegend	505808
Мышь	Fc-блок	N/A	Biolegend	101320
Нет	Zombie Violet	BV421	Biolegend	423114

Результаты

[00150] Как показано на Фиг.2, IL-15 повышает экспрессию PD-1 в PMEL T-клетках. Затем разрабатывали и проводили три исследования на основе комбинации PMEL, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, и антитела против PD-L1 (Исследование 1, 2 и 3), как показано на Фиг.3, 6 и 9, соответственно.

[00151] Фиг.4: Исследование 1 показывает, что αPD-L1 повышает противоопухолевую активность подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™

PMEL Т-клеток в присутствии лимфодеплеции (CPX). При отсутствии CPX α PD-L1 не повышает противоопухолевую активность DEEPTM-15 PMEL. В присутствии CPX антитело против PD-L1 повышает противоопухолевую активность DEEPTM-15 PMEL.

[00152] Фиг.5: Исследование 1 показывает, что подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEPTM PMEL Т-клетки в комбинации с α PD-L1 повышают противоопухолевую активность, повышают выживаемость без опухолей (TFS), не приводят к изменениям в плане действия IL15-Fc и хорошо переносятся без изменений в плане массы тела.

[00153] Фиг.7: Исследование 2 показывает, что DP-15 PMEL + антитело против PD-L1 показывают улучшенную противоопухолевую активность и выживаемость по сравнению с PMEL + антителом против PD-L1.

[00154] В частности для исследования 2 мышей подвергали лечению CPX (4 мг/мышь), когда опухоли достигали среднего объема 33,6 мм³ (День 1). На следующий день (День 2) мышам вводили инертный носитель (HBSS), α PD-L1 (10 мг/кг, дважды в неделю в течение всего исследования), подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEPTM IL-15 PMEL Т-клетки (5×10^6 , одна единичная в/в инъекция) самостоятельно или в комбинации с α PD-L1 (10 мг/кг, дважды в неделю в течение всего исследования).

[00155] Лечение с помощью PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, самостоятельно приводило к статистически значимому ингибированию роста опухолей по сравнению с лечением с применением либо инертного носителя или α PD-L1 самостоятельно, которые не имели противоопухолевой активности по сравнению с контролем в виде инертного носителя (Фиг. 8). Лечение с помощью PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, самостоятельно также вызывало 3/10 полных регрессий (CR, определяются как объем опухолей $\leq 13,5$ мм³ в рамках трех последовательных измерений). Противоопухолевая активность PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, также повышалась при добавлении α PD-L1, при этом 100% (10/10) животных в группе с данной комбинацией демонстрировали CR. В конце данного исследования (День 76, 74 дня после АСТ) 60% (6/10) подвергаемых лечению данной комбинацией мышей все еще демонстрировали CR и были классифицированы как не имеющие опухолей (TFS) (Фиг.8). TFS отсутствовали в группе, получавшей PMEL Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEPTM, без

сопутствующей блокады контрольных точек.

[00156] Все мыши, получавшие инертный носитель и PD-L1, достигали конечной точки (определенной как объем опухолей $\geq 1500 \text{ мм}^3$) к 20 дню после АСТ (День 22) (Фиг.8). Медианная выживаемость составляла 20 дней для обеих данных контрольных групп. Всех мышей, подвергаемых лечению PMEL Т-клетками, подвергнутыми праймингу с помощью IL-15 DEEP™, умерщвляли между 32 днем и 53 днем после АСТ (День 34 – День 55, соответственно), при этом медианная выживаемость составляла 39,5 дней. С другой стороны, 6/10 мышей, подвергнутых лечению PMEL Т-клетками, подвергнутыми праймингу с помощью IL-15 DEEP™, в комбинации с α PD-L1, все еще участвовали в исследовании к концу эксперимента (74 дня после АСТ или в День 76), при этом все они не имели опухолей (TFS). Это показывает дальнейшее улучшение противоопухолевой активности за счет добавления лечения на основе PD-L1 в рамках терапии на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™.

[00157] Показатели массы тела отслеживали ежедневно в начале исследования (День 1-5), затем дважды в неделю до завершения исследования. Все способы лечения хорошо переносились в рамках эксперимента (Фиг.8), включая первые две недели (Фиг.8). Кратковременное не являющееся токсикологически релевантным небольшое снижение массы тела по сравнению с первоначальной массой (в День 1) наблюдали в День 2 у группы, получавшей PMEL Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™ (-2,5%). Показатели массы тела восстановились к Дню 3. По сравнению с получавшими инертный носитель и α PD-L1 мышами, в случае PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, самостоятельно или в комбинации с α PD-L1 наблюдали сниженную прибавку веса. Данное наблюдение было вероятно связано со сниженным ростом опухолей (Фиг.8) по сравнению с мышами, получавшими инертный носитель и α PD-L1.

[00158] Сэндвич-ELISA (антитело захвата против Fc с последующим антителом детектирования против IL-15) применяли для измерения содержания IL15-Fc в крови (в День 3, День 6 и День 20; 1, 4 и 18 дня спустя после АСТ, соответственно) у мышей, которым инъецировали PMEL Т-клетки, подвергнутые праймингу с помощью IL-15 DEEP™, самостоятельно или в комбинации с α PD-L1. Результаты показаны на Фиг.8. Системный IL15-Fc подвергали количественному анализу в День 3 и День 6, при этом

он являлся недетектируемым в День 20. Системное воздействие вследствие IL15-Fc не было затронуто из-за добавления α PD-L1 в рамках курса лечения.

[00159] Комбинация PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с α PD-L1 приводила к более значительной активации PMEL Т-клеток в рамках микросреды опухоли при измерении на основе повышенного IFN- γ POS PMEL Т-клеток в опухоли (Фиг. 10). Кроме того, более высокие процентные показатели IFN- γ POS PMEL Т-клеток детектировали среди PD1-положительного подмножества PMEL Т-клеток, что соответствует фенотипу активации.

Обсуждение

[00160] В рамках данного исследования авторы оценивали противоопухолевую активность единичной дозы в виде 5×10^6 PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, самостоятельно или в комбинации с блокадой PD-L1 у мышей с опухолями B16-F10. Контрольные группы включали мышей, получавших инертный носитель и α PD-L1 в качестве единственного агента. Лечение α PD-L1 самостоятельно не приводило к замедленному росту опухолей по сравнению с инертным носителем. Адаптивный перенос клеток (АСТ) на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, приводил к статистически значимому ингибированию роста опухолей и повышенной выживаемости по сравнению с инертным носителем или контролем в виде α PD-L1. Комбинирование PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с α PD-L1 приводило к статистически значимому улучшению противоопухолевой активности и повышенной выживаемости по сравнению с данными агентами по отдельности. Важно, что АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с/без блокады PD-L1 хорошо переносился, при этом присутствовала лишь малая кратковременная не являющаяся токсикологически значимой потеря массы тела по сравнению с исходными показателями массы перед началом лечения. Пониженный набор массы тела по сравнению с мышами, получавшими инертный носитель или α PD-L1, был вероятно связан с пониженным ростом опухолей. Наконец, добавление блокирующего α PD-L1 антитела к PMEL Т-клеткам, подвергнутым праймингу с помощью IL-15 DEEP™, не повышало системных уровней IL15-Fc. Данные факты совместно свидетельствуют о том, что комбинация в виде PMEL Т-клеток,

подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, и блокады PD-L1 обеспечивает противоопухолевую эффективность без провоцирования высокой токсичности у мышей.

[00161] В заключение комбинирование АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, и блокады PD-L1 обеспечивает противоопухолевую эффективность без провоцирования высокой токсичности у мышей. Лечение с применением PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, приводило к статистически значимому ингибированию роста опухолей и повышало выживаемость по сравнению с контролем в виде инертного носителя или единственным агентом в виде αPD-L1, включая 3/10 CR но без TFS. Комбинирование АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с блокадой PD-L1 вызывало статистически значимое улучшение ингибирования роста опухолей по сравнению с контролем в виде инертного носителя или отдельными агентами. Комбинирование АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с αPD-L1 повышало медианную выживаемость по сравнению с обоими данными агентами по отдельности и приводило к 10/10 CR и 6/10 TFS при окончании исследования (в День 76). Все виды лечения хорошо переносились. АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, с/без блокады PD-L1 сопровождался лишь малой кратковременной не являющейся токсикологически значимой потерей массы тела по сравнению с исходными показателями массы перед началом лечения. АСТ на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью IL-15 DEEP™, самостоятельно или в комбинации с αPD-L1 приводил к сниженному набору массы тела по сравнению с мышами, получавшими инертный носитель или αPD-L1. Данное наблюдение было вероятно связано со сниженным ростом опухолей. Добавление αPD-L1 к терапии на основе PMEL Т-клеток, подвергнутых праймингу с помощью DEEP™, не влияло на системное воздействие вследствие IL15-Fc.

Пример 3: комбинирование DEEP™ IL-12 с ингибированием контрольных точек повышает стабильность противоопухолевого воздействия

[00162] Связанные с поверхностью IL-12 оценивали на предмет способности стимулировать противоопухолевый ответ на ингибирование иммунных контрольных

точек. Конструировали связанный продукт слияния на основе IL-12 (IL-12 TF; chM1Fab-IL-12) для обеспечения связывания IL-12 с PMEL T-клетками в соответствии с Международными РСТ публикациями WO 2019/010219 и WO 2019/010222, каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

[00163] Для оценки способности комбинации, включающей опухоль-специфичную клеточную терапию с IL-12 TF и ингибитором контрольных точек, стимулировать противоопухолевую эффективность, ингибирование роста опухолей и эффекты в плане микросреды опухолей оценивали с помощью модели рака в виде терапии на основе PMEL/B16-F10 T-клеток. Кратко, C57BL/6J мышам внутрикожно инокулировали 400000 клеток меланомы B16-F10. Отдельным образом CD8 T-клетки выделяли из Pmel-1 мышей, которые экспрессируют T-клеточный рецептор, являющийся специфичным для антигена gp 100 мыши в клетках меланомы B16-F10. CD8 T-клетки мыши активировали в течение двух дней с помощью антител против рецепторов CD3 и CD28 мыши и затем подвергали экспансии в присутствии IL-21 в течение двух дней. Кратко, выделенные CD8 T-клетки инкубировали в полной среде (содержащей RPMI 1640, 10% FBS, инсулин-трансферрин-селен, пенициллин/стрептомицин, и 50 мМ бета-меркаптоэтанол) в планшетах Nunc HighBind, которые были предварительно покрыты антителами против CD3 и CD28 рецепторов мыши; при этом антитела против CD3 и CD28 наносили в концентрации 0,5 мкг/мл и 5 мкг/мл, соответственно. После приблизительно 24 ч инкубирования на покрытых антителами планшетах добавляли IL-2 и IL-7 до конечных концентраций 20 нг/мл и 0,5 нг/мл, соответственно. После второго дня инкубирования клетки выделяли из покрытых антителами планшетов и разбавляли до плотности приблизительно 200000 клеток /мл в среде, содержащей IL-21, при конечной концентрации 20 нг/мл. После экспансии в течение одного дня в IL-21 клетки снова разбавляли до плотности приблизительно 20000 клеток/мл в среде, содержащей IL-21, до конечной концентрации 20 нг/мл. Затем клетки выделяли, промывали и инкубировали с IL-12 TF (chM1Fab-scIL-12p70) при концентрации 125 нМ в течение 30 минут при 37°C и далее три раза промывали для удаления несвязанного IL-12 TF. Клетки ресуспендировали в HBSS и подвергали адаптивному переносу (5×10^6 клеток/мышь) мышам с опухолями B16-F10 с помощью инъекции в хвостовую вену. В качестве контролей мышей также подвергали лечению HBSS или PMEL T-клетками по отдельности. Спустя один день после адаптивного переноса клеток мыши с опухолями получали 4 мг

циклофосфида. Антитело против PD-L1 (клон 10F.9G2) вводили внутривенно два раза в неделю в течение шести недель при дозировке 200 мкг в расчете на одну дозу. Вторую и третью дозу PMEL Т-клеток, связанных с IL-12 TF, вводили спустя 14 и 28 дней после первой дозы клеток. Данную вторую и третью дозу вводили при отсутствии лечения на основе циклофосфида (то есть циклофосфамид присутствовал только перед первой дозой клеток). В международной РСТ публикации WO 2019/010219 показано, что несколько доз опухоль-специфичных Т-клеток, нагруженных IL-12 TF — но не несколько доз опухоль-специфичных Т-клеток самостоятельно — повышают противоопухолевую выживаемость по сравнению с единичной дозой Т-клеток. Таким образом, в рамках данного исследования анализировали использование нескольких доз только для Т-клеток, нагруженных IL-12 TF.

[00164] Анализ выживаемости на Фиг.11 показывает, что IL-12 TF стимулирует противоопухолевую активность по сравнению с PMEL Т-клетками самостоятельно, при этом несколько доз PMEL Т-клеток, соединенных с IL-12 TF, также повышают противоопухолевую эффективность. В каждом случае — в рамках комбинации с единичными или множественными дозами PMEL Т-клеток, соединенными с IL-12 TF — комбинирование с ингибитором контрольных точек в виде антитела против PD-L1 также повышало противоопухолевую эффективность. Это характеризуется как повышением медианной выживаемости, так и повышением количества длительно выживших.

[00165] Для оценки эффектов комбинационной иммунотерапии на микросреду опухолей проводили отдельное исследование для оценки биомаркеров воспаления в опухоли после комбинационной иммунотерапии. IFN γ представляет собой ключевой цитокин, продуцируемый IL-12, который опосредует большинство провоспалительных эффектов IL-12. Мышей подвергали лечению PMEL Т-клетками и PMEL Т-клетками, соединенными с IL-12 TF (chM1Fab-scIL-12), как описано выше, и затем умерщвляли спустя семь дней после лечения и анализировали на предмет экспрессии IFN γ и PD-L1 в опухоли с помощью ELISA или Luminex. Статистическая значимость анализировалась с помощью одностороннего дисперсионного анализа с последующим пост-тестом Тьюки для сравнения всех образцов друг с другом. PMEL Т-клетки, соединенные с IL-12 TF, стимулировали продуцирование IFN γ в отличие от PMEL Т-клеток самостоятельно, при этом продуцирование IFN γ было также повышено при

комбинировании IL-12 TF с антителом против PD-L1 (Фиг.12). Лечение на основе антитела против PD-L1 не стимулировало продуцирование IFNg при комбинировании с PMEL T-клетками самостоятельно (Фиг.12). Без связи с теорией считается, что данная комбинация обеспечивает неожиданно повышенную противоопухолевую эффективность, по меньшей мере, частично вследствие стимулирования провоспалительных эффектов IL-12 TF в опухоли. Данные эффекты сопровождалось снижением видимой концентрации PD-L1 в опухоли. Без связи с теорией также считается, что антитело против PD-L1 может связываться с теми же эпитопами на белке PD-L1, что и антитела в рамках анализа ELISA. Авторы интерпретируют это как свидетельство того, что антитело против PD-L1 снижает биологически доступную концентрацию PD-L1 в опухоли.

МОДИФИКАЦИИ

[00166] Модификации и вариации описанных способов и композиций согласно настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области без выхода за рамки объема и духа изобретения. Несмотря на то, что изобретение было описано в плане конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что изобретение в рамках формулы изобретения не должно неоправданным образом ограничиваться подобными конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации описанных вариантов реализации изобретения являются намеренными и очевидными специалистам в области, к которой относится изобретение, и находятся в рамках объема изобретения, как следует из нижеследующей формулы изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

[00167] Все патенты и публикации, упомянутые в данном описании, приведены здесь в качестве ссылки в том же контексте, как если бы отдельный патент и публикация была бы конкретно и отдельным образом указана в виде включенной в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, включающая:

ядросодержащую клетку, нагруженную несколькими белковыми кластерами и/или иммуностимулирующими слитыми молекулами (IFM); и

ингибитор ингибитора контрольных точек;

при этом каждый белковый кластер включает несколько терапевтических белковых мономеров, обратимо подвергнутых поперечному сшиванию друг с другом с помощью нескольких биорасщепляемых поперечносшивающих линкеров, при этом белковый кластер имеет размер от 30 нм до 1000 нм в диаметре при измерении с помощью динамического рассеяния света, при этом поперечносшивающий линкер расщепляется после введения нуждающемуся в этом субъекту при физиологических условиях с высвобождением терапевтических белковых мономеров из белкового кластера, при этом необязательно белковый кластер также включает модификацию поверхности, такую как поликатион, для обеспечения ассоциации белкового кластера с ядросодержащей клеткой;

при этом каждая IFM сконструирована таким образом, чтобы включать иммуностимулирующую цитокиновую молекулу и часть для нацеливания (например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), имеющую аффинность к антигену на поверхности ядросодержащей клетки, при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула является функционально связанной с частью для нацеливания.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что ядросодержащая клетка получена из популяции Т-клеток, которые были обогащены или обучены для обладания специфичностью против одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА).

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что ядросодержащая клетка является по существу очищенной.

4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что ядросодержащая клетка является аутологичной по отношению к субъекту, нуждающемуся в композиции.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что терапевтические белковые мономеры

включают одну или несколько цитокиновых молекул и необязательно одну или несколько костимулирующих молекул, при этом:

- (i) указанная одна или несколько цитокиновых молекул выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1альфа, IL-1бета, IL-5, IFNгамма, TNFa, IFNальфа, IFNбета, GM-CSF, или GCSF; а
- (ii) указанная одна или несколько костимулирующих молекул выбраны из CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40, или CD3.

6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что в IFM иммуностимулирующая цитокиновая молекула выбрана из одного или нескольких из IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 или IL-27 или их вариантных форм, и отличающаяся тем, что антиген выбран из одного или нескольких из CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CD16, CD56, CD137, OX40 или GITR.

7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что ингибитор контрольных точек представляет собой один или несколько из PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 или CTLA-4.

8. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что ингибитор ингибитора контрольных точек представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается и нейтрализует или ингибирует ингибитор контрольных точек.

9. Способ осуществления иммунотерапии рака, включающий:

введение нуждающемуся в этом пациенту нескольких ядросодержащих клеток, нагруженных несколькими белковыми кластерами и/или иммуностимулирующими слитыми молекулами (IFM); и

введение пациенту ингибитора ингибитора контрольных точек;

при этом каждый белковый кластер включает несколько терапевтических белковых мономеров, обратимо подвергнутых поперечному сшиванию друг с другом с помощью нескольких биорасщепляемых поперечносшивающих линкеров, при этом белковый кластер имеет размер от 30 нм до 1000 нм в диаметре при измерении с помощью динамического рассеяния света, при этом поперечносшивающий линкер

расщепляется после введения нуждающемуся в этом субъекту при физиологических условиях с высвобождением терапевтических белковых мономеров из белкового кластера, при этом необязательно белковый кластер также включает модификацию поверхности, такую как поликатион, для обеспечения ассоциации белкового кластера с ядродержащей клеткой;

при этом каждая IFM сконструирована таким образом, чтобы включать иммуностимулирующую цитокиновую молекулу и часть для нацеливания (например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), имеющую аффинность к антигену на поверхности ядродержащей клетки, при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула является функционально связанной с частью для нацеливания.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что ядродержащая клетка является по существу очищенной.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что ядродержащая клетка является аутологичной по отношению к субъекту, нуждающемуся в композиции.

12. Способ по п.9, дополнительно включающий введение ядродержащей клетки и ингибитора ингибитора контрольных точек по отдельности.

13. Способ по п.9, дополнительно включающий введение ядродержащей клетки и ингибитора ингибитора контрольных точек последовательно.

14. Способ по п.9, отличающийся тем, что ядродержащая клетка получена из популяции Т-клеток, которые были обогащены или обучены для обладания специфичностью против одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА).

15. Способ по п.9, отличающийся тем, что терапевтические белковые мономеры включают одну или несколько цитокиновых молекул и необязательно одну или несколько костимулирующих молекул, при этом:

- (i) указанная одна или несколько цитокиновых молекул выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1альфа, IL-1бета, IL-

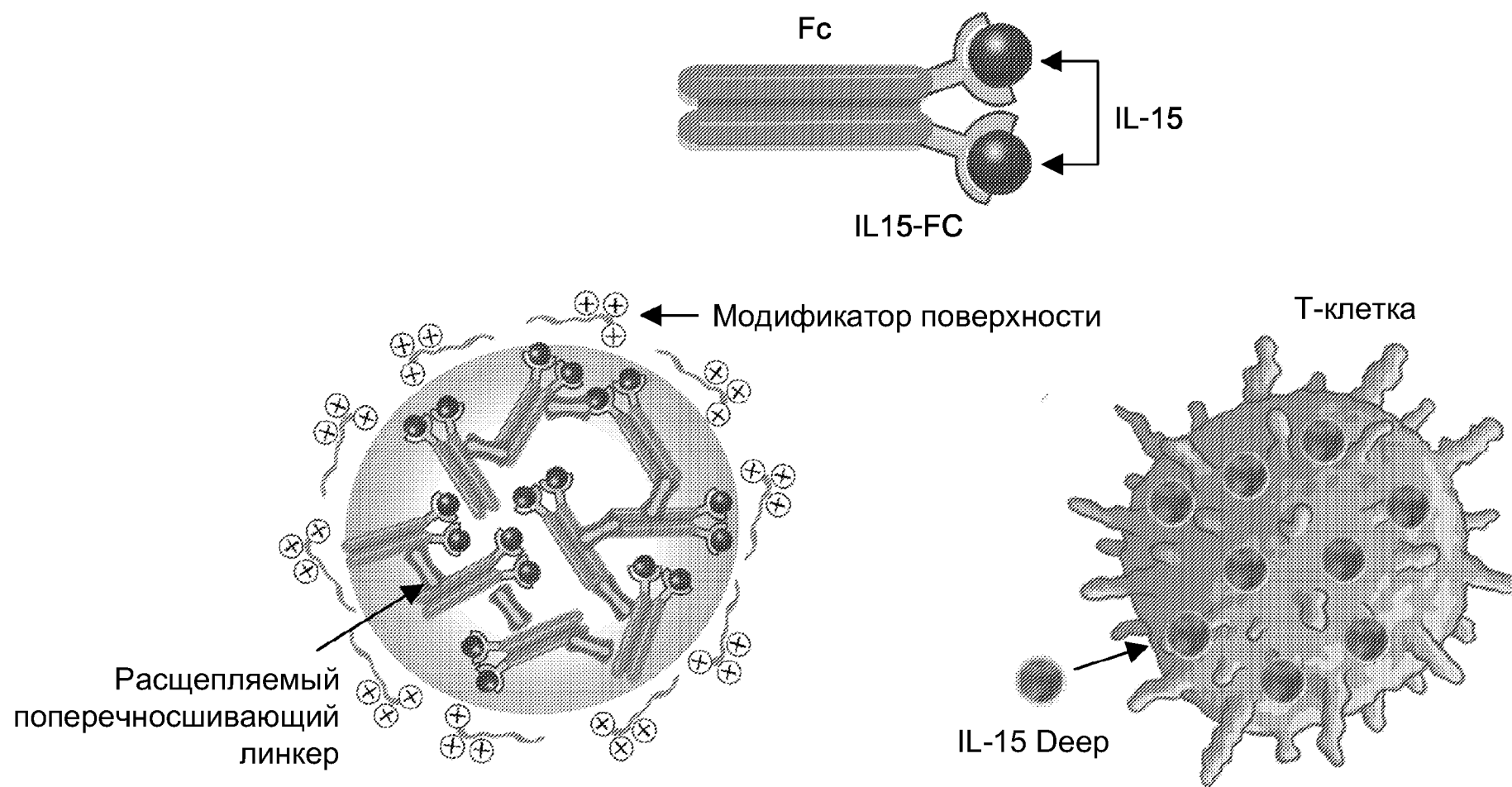
5, IFN γ , TNF α , IFN α , IFN β , GM-CSF, или G-CSF; а

- (ii) указанная одна или несколько костимулирующих молекул выбраны из CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40, или CD3.

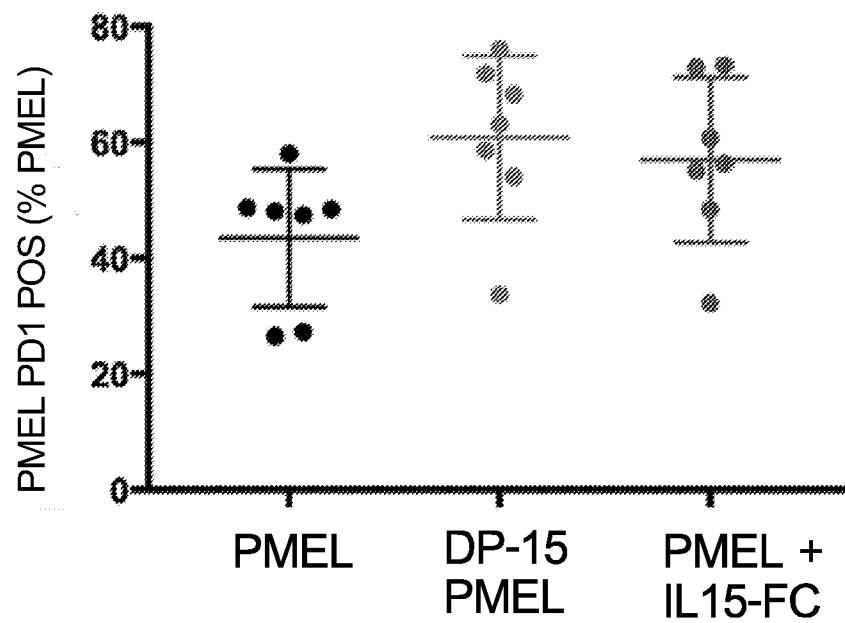
16. Способ по п.9, отличающийся тем, что в IFM иммуностимулирующая цитокиновая молекула выбрана из одного или нескольких из IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 или IL-27 или их вариантных форм, и отличающийся тем, что антиген выбран из одного или нескольких из CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CD16, CD56, CD137, OX40 или GITR.

17. Способ по п.9, отличающийся тем, что ингибитор контрольных точек представляет собой один или несколько из PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 или CTLA-4.

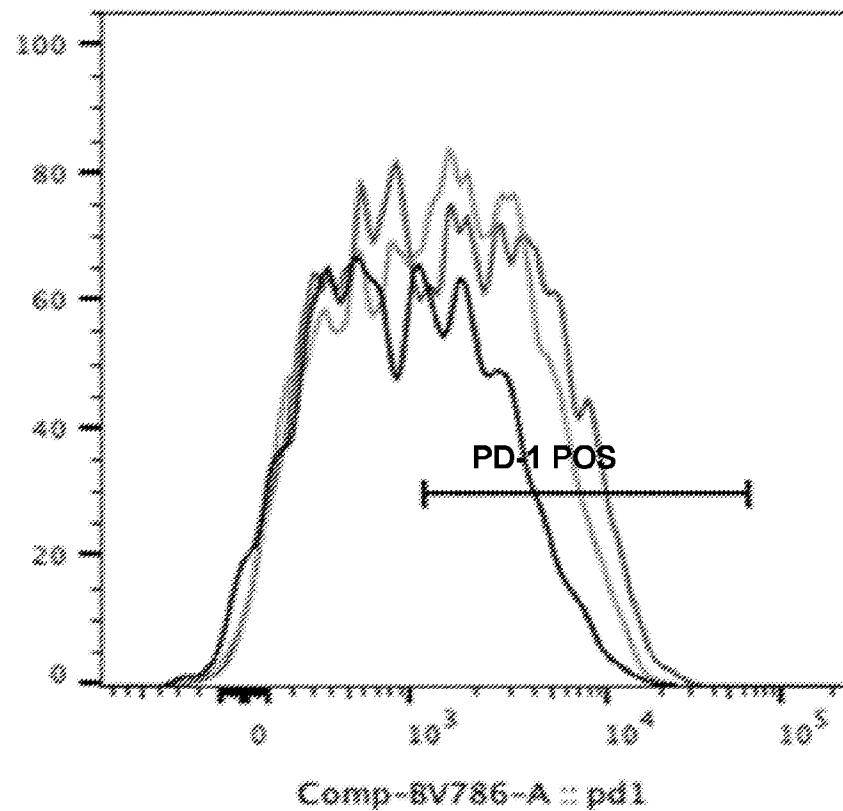
18. Способ по п.9, отличающийся тем, что ингибитор ингибитора контрольных точек представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается и нейтрализует или ингибирует ингибитор контрольных точек.



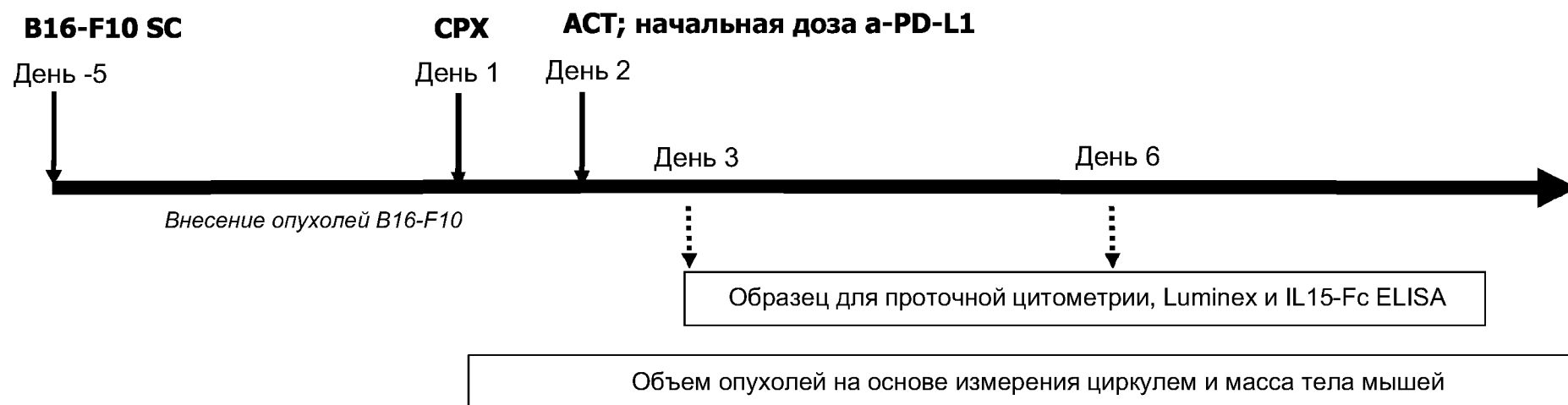
Фиг.1



Нормализация по режиму



Фиг.2



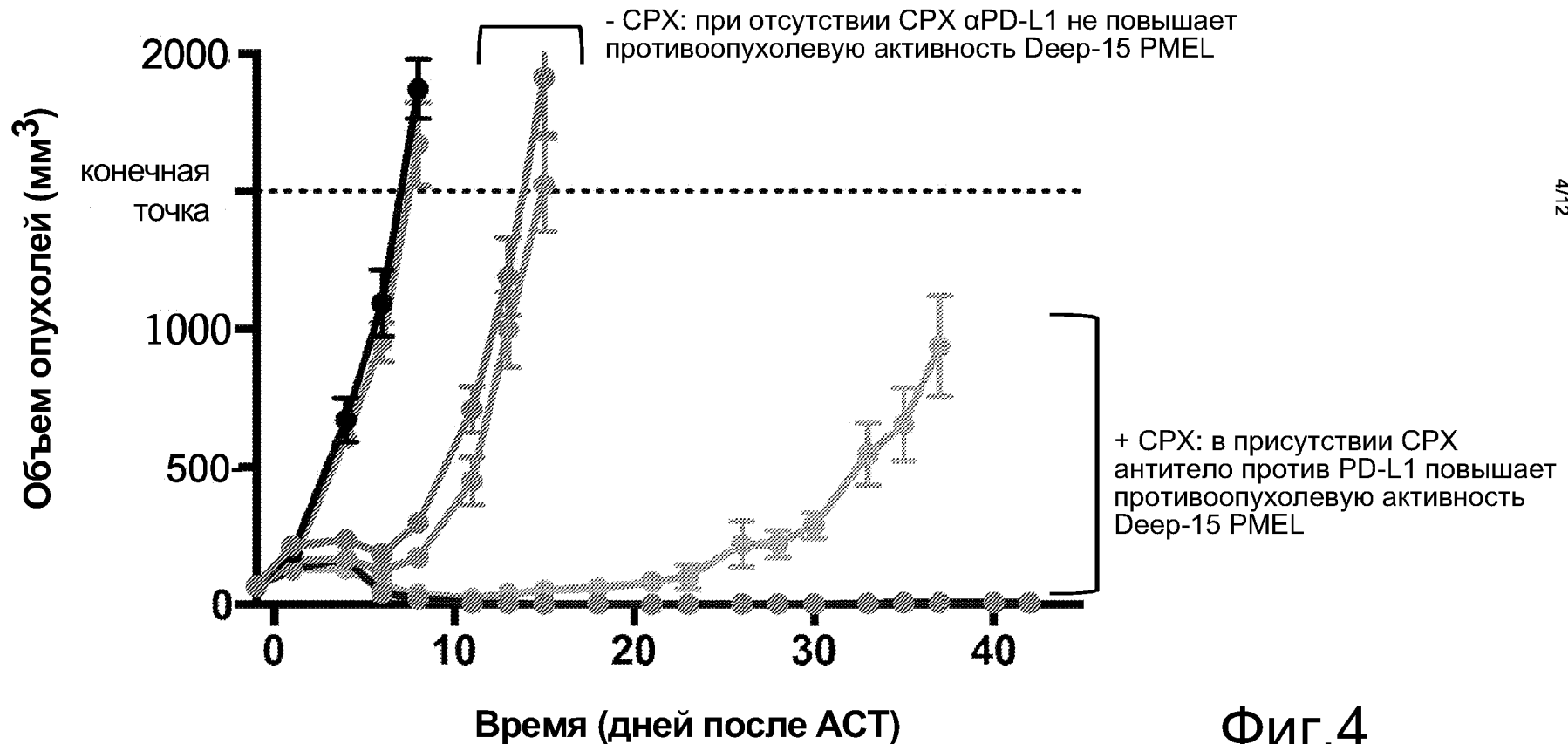
3/12

Исследование 1

Группа	Лечение
1	DP-15 PMEL (10×10^6)
2	DP-15 PMEL (30×10^6)
3	HBSS
4	α-PD-L1
5	DP-15 PMEL (10×10^6) + α-PD-L1
6	DP-15 PMEL (30×10^6) + α-PD-L1
7	CPX > DP-15 PMEL (10×10^6) + α-PD-L1
8	CPX > DP-15 PMEL (10×10^6)

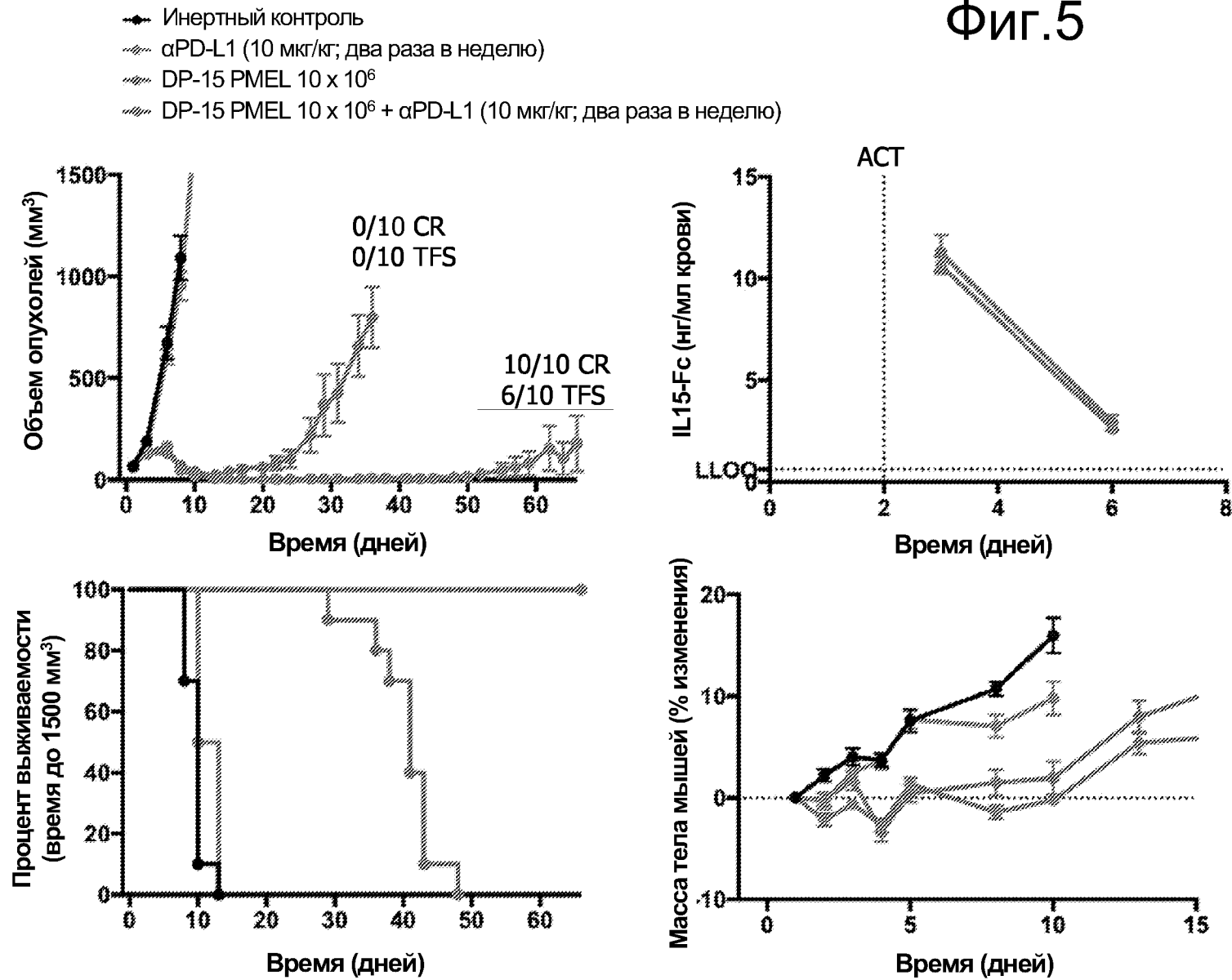
Фиг.3

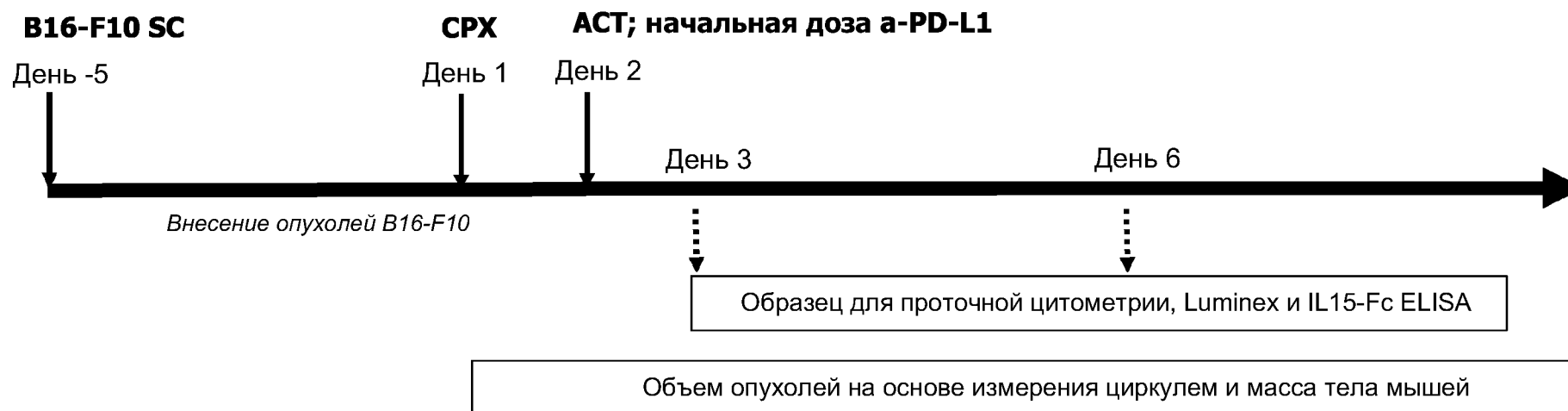
- Инертный контроль
- ▨— Антитело против PD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)
Deer-15 10×10^6
- ▨— Deer-15 30×10^6
- ▨— Deer-15 10×10^6 + антитело против PD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)
- ▨— Deer-15 30×10^6 + антитело против PD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)
- ▨— CPX > Deer-15 10×10^6
- ▨— CPX > Deer-15 10×10^6 + антитело против PD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)



Фиг.4

Фиг.5



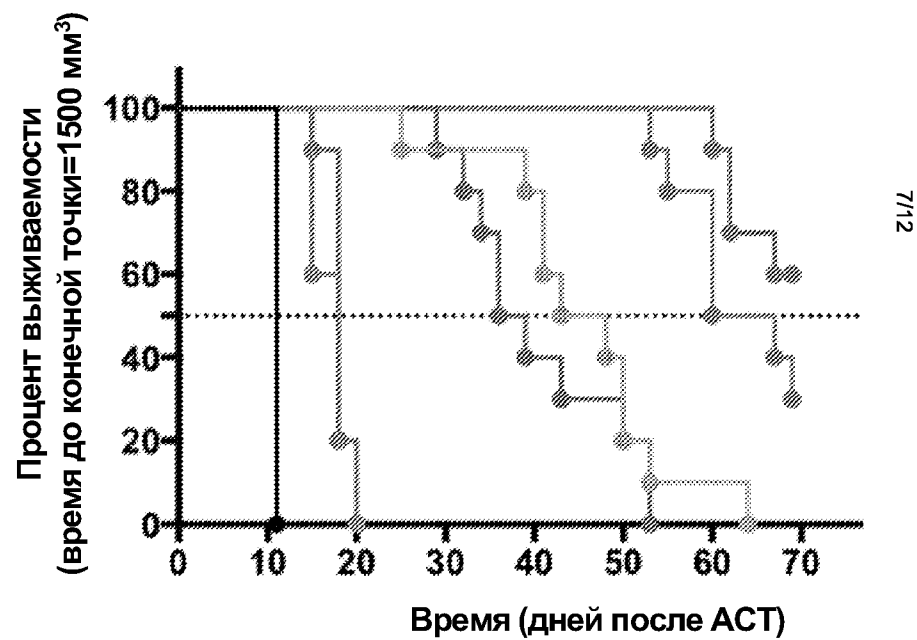
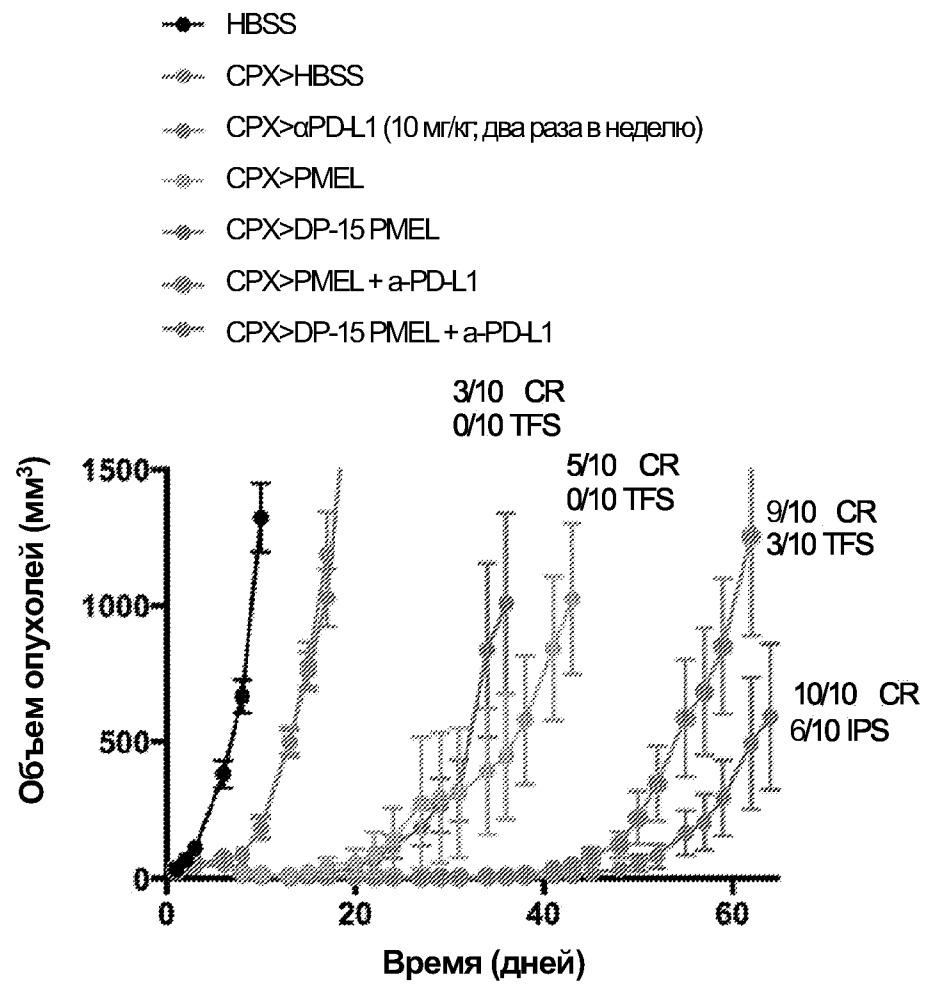


6/12

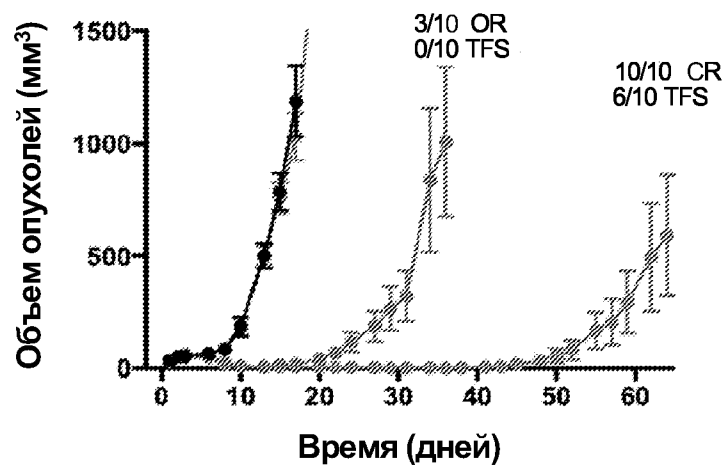
Исследование 2

Группа	Лечение
1	HBSS
2	CPX > HBSS
3	CPX > α-PD-L1
4	CPX > PMEL (5 x 10 ⁶)
5	CPX > DP-15 PMEL (5 x 10 ⁶)
6	CPX > PMEL (5 x 10 ⁶) + α-PD-L1
7	CPX > DP-15 PMEL (5 x 10 ⁶) + α-PD-L1

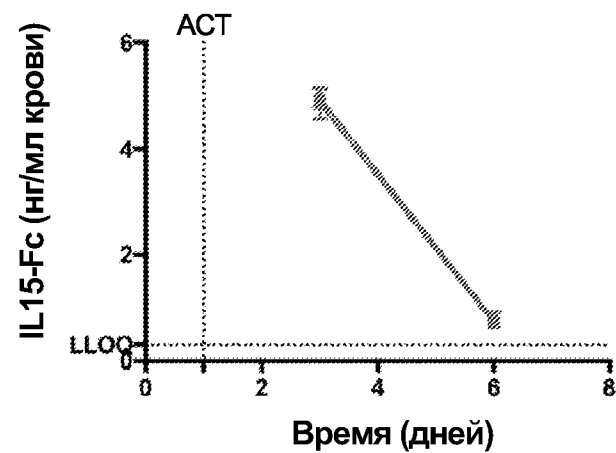
Фиг.6



Фиг.7



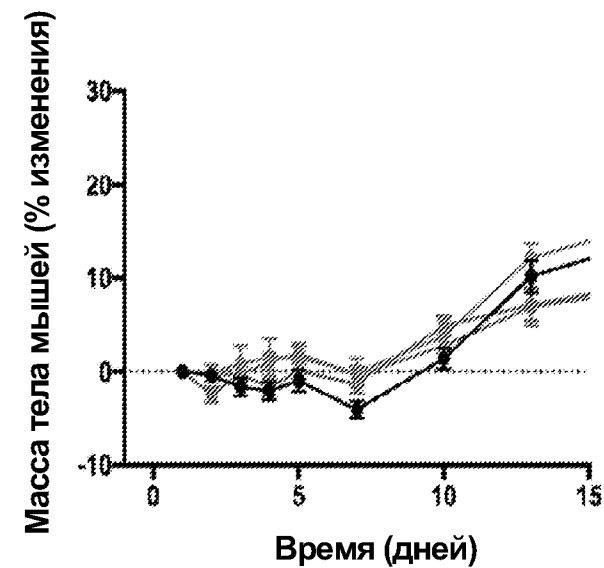
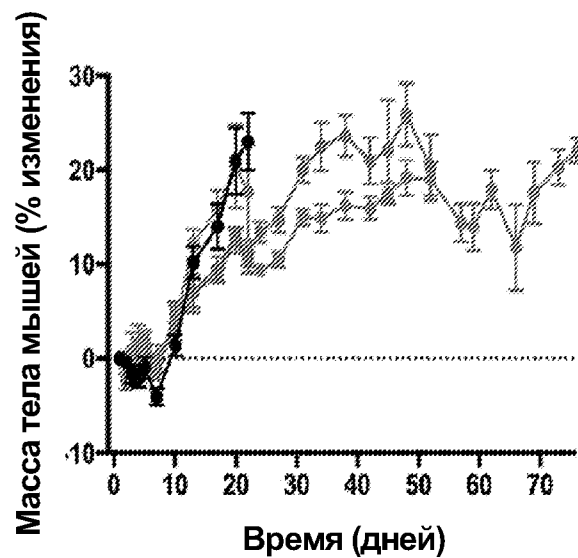
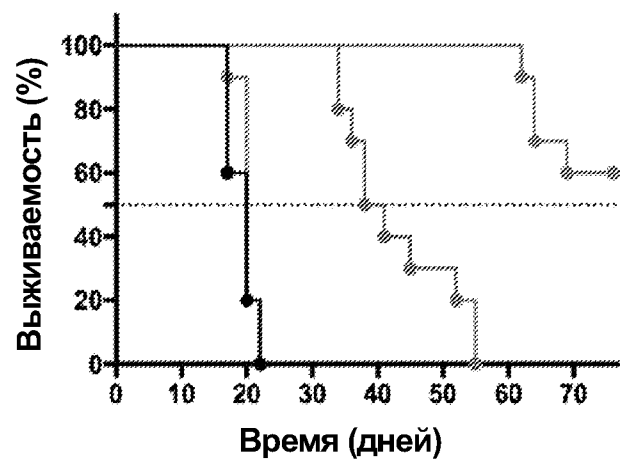
- Инертный контроль
- ▨ αPD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)
- ▧ DP-15 PMEL (5×10^6)
- ▩ DP-15 PMEL (5×10^6) + αPD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)

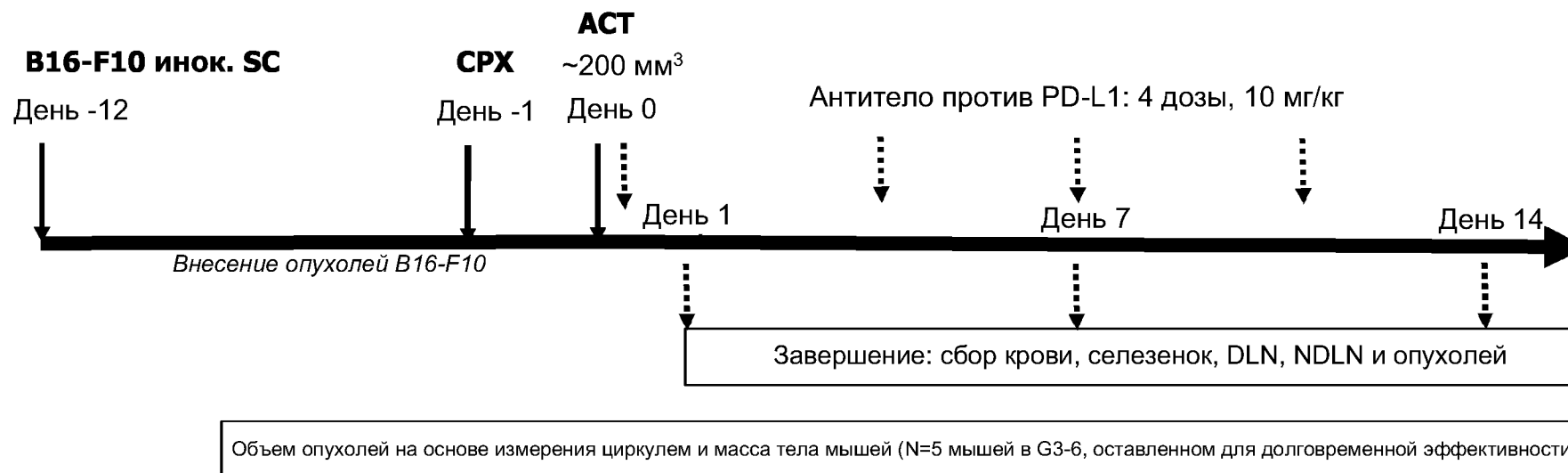


- ▧ DP-15 PMEL (5×10^6)
- ▩ DP-15 PMEL (5×10^6) + αPD-L1 (10 мг/кг; два раза в неделю)

Фиг.8

8/12

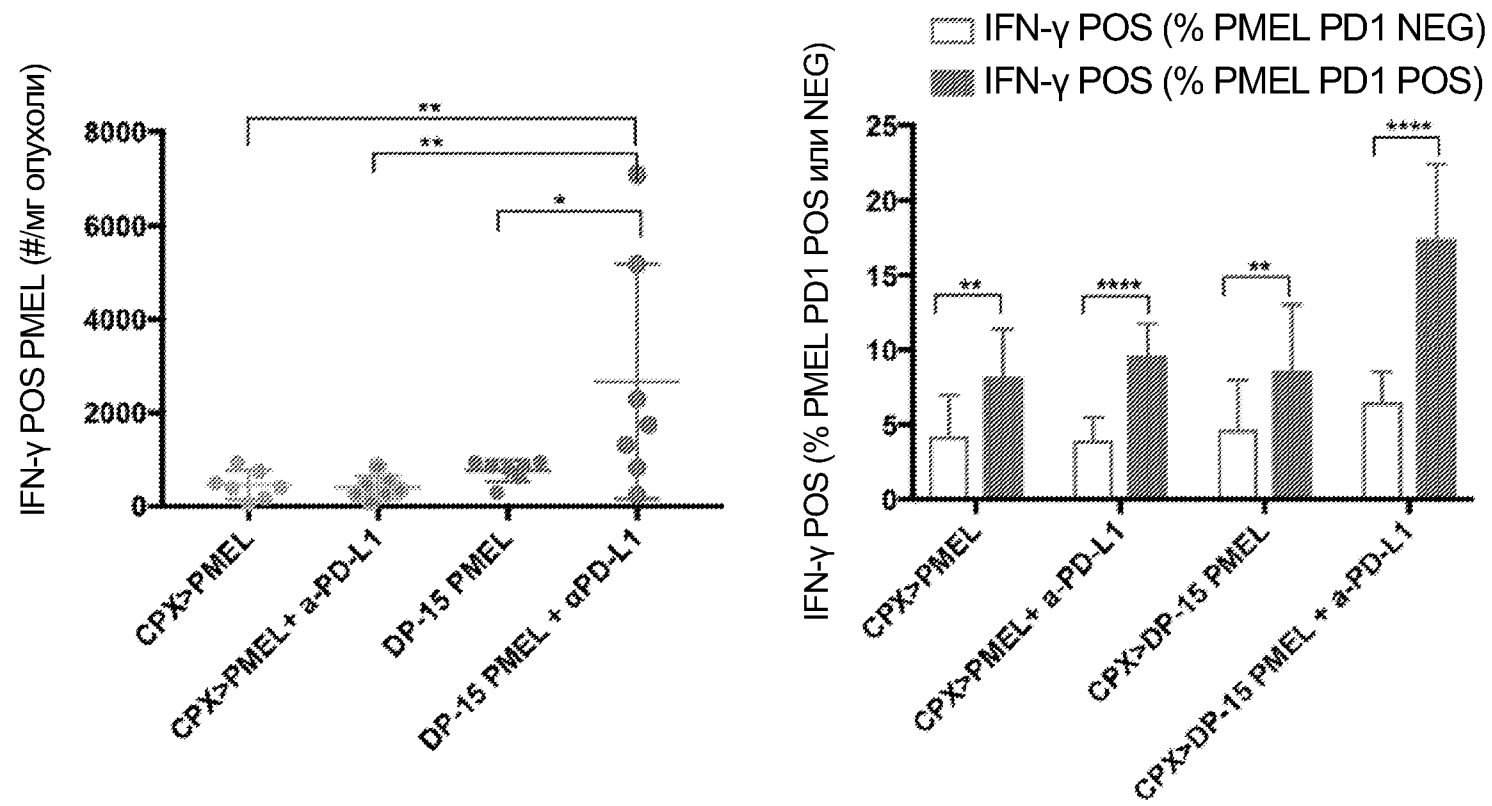




Исследование 3 (в присутствии CPX)

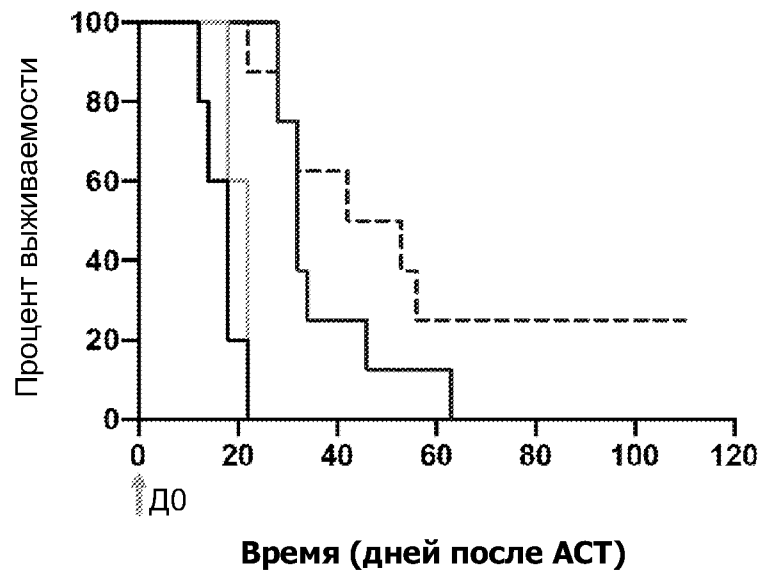
Группа	Лечение
1	CPX > HBSS
2	CPX > α-PD-L1
3	CPX > PMEL (10 × 10 ⁶)
4	CPX > DP-15 PMEL (10 × 10 ⁶)
5	CPX > PMEL (10 × 10 ⁶) + α-PD-L1
6	CPX > DP-15 PMEL (10 × 10 ⁶) + α-PD-L1
7	CPX > PMEL (10 × 10 ⁶) + IL15-Fc (0,2 мкг/кг)
8	CPX > PMEL (10 × 10 ⁶) + IL15-Fc (0,2 мкг/кг) + α-PD-L1
9	CPX > PMEL (10 × 10 ⁶) + IL15-Fc (MTD, 10 мкг)

Фиг.9

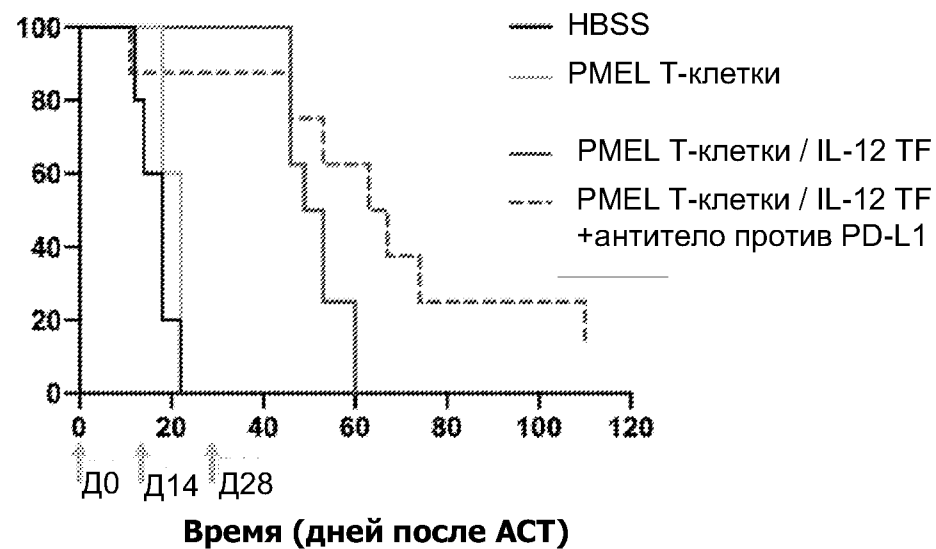


Фиг.10

(А) 1х доза
PMEL T-клетки / IL-12 TF



(В) 3х дозы
PMEL T-клетки / IL-12 TF

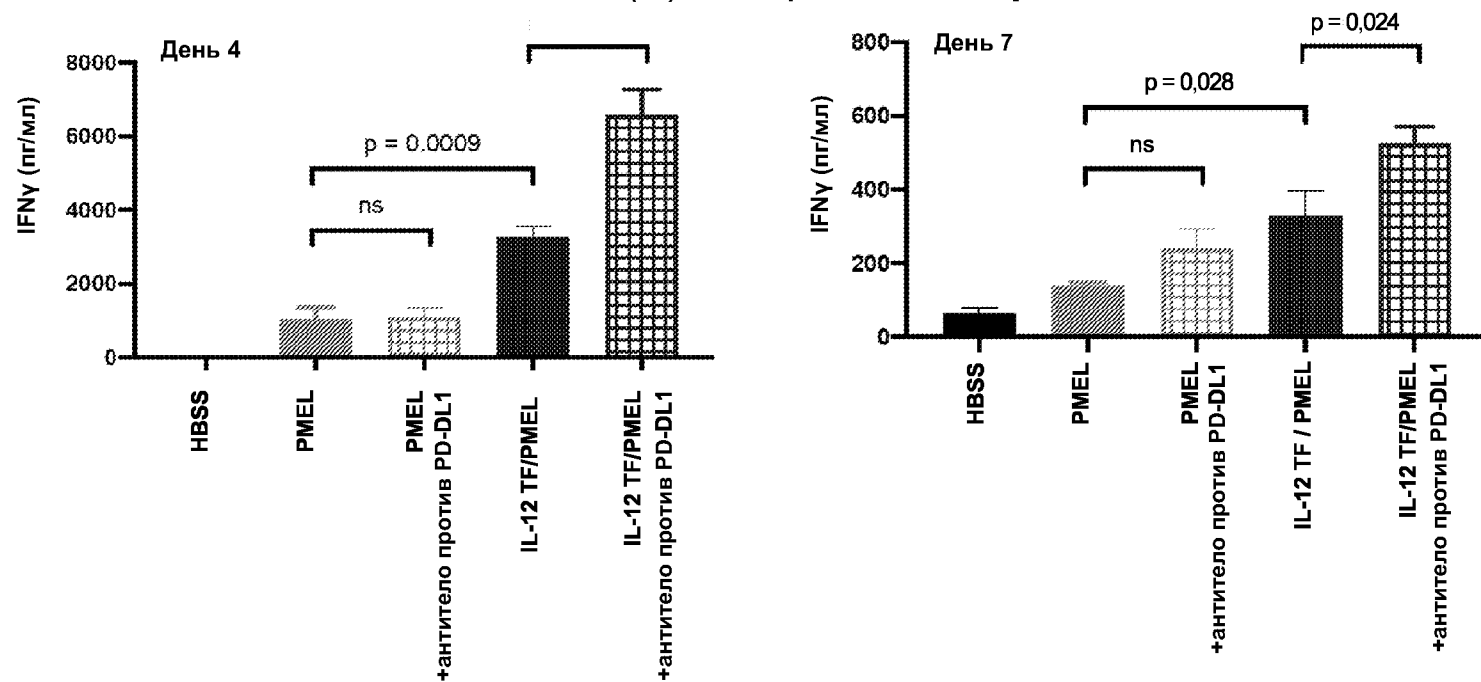


(С) Медианная выживаемость (дней)

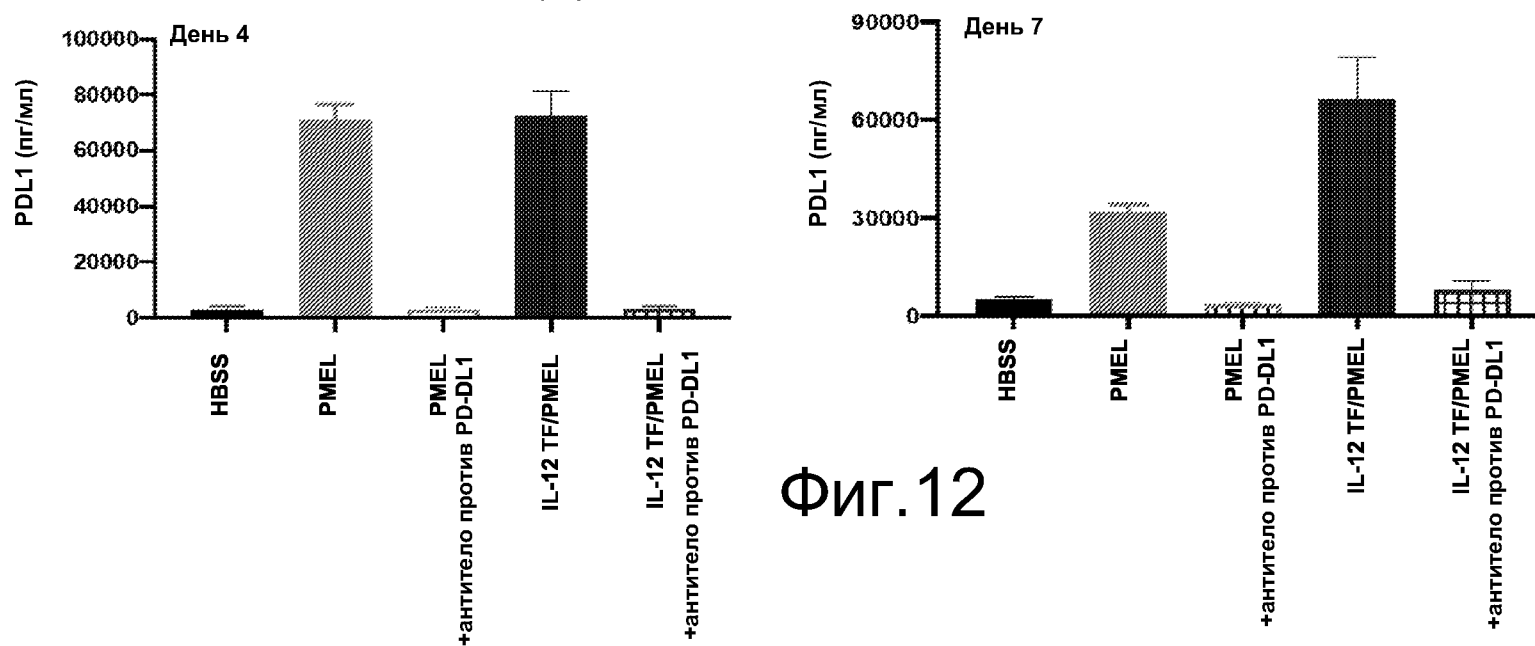
HBSS	18
PMEL	22
PMEL/Deep IL-12 (1х)	32
PMEL/Deep IL-12 (1х) + антитело против PD-L1	47.5
PMEL/Deep IL-12 (3х)	51
PMEL/Deep IL-12 (3х) + антитело против PD-L1	65

Фиг.11

(A) Экспрессия IFN γ



(B) Экспрессия PD-L1



Фиг.12