# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2022.02.18
- (22) Дата подачи заявки 2020.05.20

- (51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01) C07K 14/715 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (54) РЕЖИМЫ ДОЗИРОВАНИЯ АГОНИСТА IL-2/IL-15Rβγ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
- (31) 19175436.5; 19177064.3
- (32) 2019.05.20; 2019.05.28
- (33) EP
- (86) PCT/EP2020/064132
- (87) WO 2020/234387 2020.11.26
- **(71)** Заявитель:

СИТЮН ФАРМА (FR)

- (72) Изобретатель:
  - Мебиус Ульрих (DE), Бешар Давид (FR), Адкинс Ирена, Подзимкова Нада (CZ)
- (74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к импульсным циклическим режимам введения и импульсным режимам введения агонистов рецептора βγ интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15Rβγ) для лечения, или облегчения, рака или инфекционных заболеваний у пациентов-людей. Режимы введения, в частности, включают ежедневное введение агонистов IL-2/IL-15Rβγ в 2, 3 или 4 последовательных дня, с последующими днями без введения.

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 571521EA/022

# РЕЖИМЫ ДОЗИРОВАНИЯ АГОНИСТА IL-2/IL-15Rβγ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

# ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Несмотря на последние успехи в лечении рака и инфекционных заболеваний, попрежнему существует неудовлетворенная медицинская потребность в более эффективных и хорошо переносимых способах лечения. Варианты иммунотерапии, то есть, способов лечения, в которых используют собственную иммунную систему организма для борьбы с болезнью, направлены на использование силы иммунной системы для уничтожения клеток злокачественной опухоли или инфицированных клеток, оставляя при этом здоровые ткани нетронутыми. В то время как иммунная система обладает врожденной способностью находить и уничтожать злокачественные новообразования, опухоли и постоянные инфекции имеют механизмы, позволяющие избежать иммунного надзора (Robinson and Schluns 2017). Возможные причины иммунной толерантности включают неудачную активацию врожденного иммунитета, участие плотной стромы в качестве физического барьера и возможный вклад иммуносупрессорных онкогенных путей (Gajewski et al. 2013). Одной из групп вариантов иммунотерапии, имеющих определенный клинический успех, является терапия цитокинами, а именно, терапия интерлейкином 2 коммерчески доступным в виде альдеслейкина/пролейкина<sup>®</sup> (Prometheus Laboratories Inc.), и интерлейкином 15 (IL-15), которые, как известно, активируют как врожденный иммунный ответ посредством NK-клеток, так и адаптивный иммунный ответ посредством CD8+ Т-клеток (Steel et al.). 2012, Conlon et al. 2019). Хотя при терапии IL-2 наблюдалась впечатляющая регрессия опухолей, ответные реакции ограничены небольшой процентной долей пациентов и сопряжены с высоким уровнем токсичности, даже опасной для жизни. Кроме того, IL-2 проявляет не только иммуностимулирующую, но и иммуносупрессорную активность, вызывая индуцированную активацией гибель Тклеток и размножение иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Treg). (Robinson and Schluns, 2017).

Как IL-2, так и IL-15, действуют через гетеротримерные рецепторы, имеющие  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  субъединицы, при этом их рецепторы имеют общую гамма-цепь ( $\gamma_c$  или  $\gamma$ ) - она также является общей в рецепторах IL-4, IL-7, IL-9 и IL-21 - и IL-2/IL-15R $\beta$  (также известный как IL-2R $\beta$ , CD122). В качестве третьей субъединицы гетеротримерные рецепторы содержат специфическую субъединицу для IL-2 или IL-15, то есть, IL-2R $\alpha$  (CD25) или IL-15R $\alpha$  (CD215). На последующих стадиях гетеротримерные рецепторы IL-2 и IL-15 коллективно используют молекулы JAK1 (янус-киназа 1), JAK 3 и STAT3/5 (переносчик сигнала и активатор транскрипции 3 и 5) для внутриклеточной сигнализации, приводящей к аналогичным функциям, однако оба цитокина также имеют различные роли, как описано в публикациях Waldmann (2015, смотри, например, таблицу 1) и Conlon (2019). Соответственно, активация разных гетеротримерных рецепторов при связывании IL-2, IL-

15, или их производных, потенциально приводит к специфической модуляции иммунной системы и потенциальным побочным эффектам. Недавно были разработаны новые соединения, направленные на активацию NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток.

Они представляют собой соединения, направленные на среднеаффинный IL-2/IL- $15R\beta\gamma$ , то есть, рецептор, состоящий из субъединиц IL-2/IL- $15R\beta$  и  $\gamma_c$ , который экспрессируется на NK-клетках, CD8<sup>+</sup> T-клетках, NKT-клетках и γδ T-клетках. Это имеет решающее значение для безопасной и сильной иммунной стимуляции, опосредованной транс-презентацией IL-15, при этом разработанные соединения RLI-15, ALT-803 и hetIL-15 уже содержат субъединицу IL-15Ra (часть) и, следовательно, имитируют транспрезентацию α-субъединицы антигенпрезентирующими клетками. RLI-15 связывается IL-15Rβγ, только среднеаффинным поскольку ОН содержит присоединенный sushi+ домен IL-15Ra. В свою очередь, RLI-15 не связывается ни с IL-15Rα, ни с IL-2Rα. Аналогично, ALT-803 и hetIL-15 несут sushi домен IL-15Rα или IL-15Rα, соответственно, растворимый И, вследствие этого, связываются среднеаффинным рецептором IL-15Rβγ. Однако из-за их нековалентного связывания существует вероятность того, что комплекс будет диссоциировать in vivo, и, следовательно, диссоциированная часть используемого комплекса будет также участвовать в другом связывании (смотри ниже). Вероятность диссоциации, судя по всему, выше для ALT-803, чем для hetIL-15, поскольку ALT-803 содержит только sushi домен IL-15Ra, который, как известно, опосредует лишь частичное связывание с IL-15, в то время как для полного связывания необходим sushi+ домен (Wei et al. 2001).

Другим примером таргетирования среднеаффинных рецепторов IL-2/IL-15Rβ является NKTR-214, гидролиз которого до его наиболее активного состояния 1-ПЭГ-IL-2 создает молекулы, в которых расположение цепей ПЭГ на стыке IL-2/IL-2Ra препятствует связыванию с высокоаффинным IL-2Ra, при этом не нарушая связывание со среднеаффинным IL-2/IL-15Rβ (Charych et al. 2016). Кроме того, мутант IL-2 IL2v, который не связывается с субъединицей IL-2Ra, является примером такого класса соединений (Klein et al. 2013, Bacac et al. 2016). Таргетирование среднеаффинных IL-2/IL-15Rβγ позволяет избежать рецепторов связанных c таргетированием высокоаффинных рецепторов IL-2 и IL-15 проблем, таких как активация регуляторных Тклеток, индуцируемая IL-2, или синдром утечки сосудов, который может быть индуцирован высокими концентрациями растворимого IL-2 или IL-15.

Это является следствием того факта, что высокоаффинный рецептор IL-2R $\alpha$  $\beta\gamma$  экспрессируется также на CD4<sup>+</sup>  $T_{reg}$  и сосудистом эндотелии, и активируется циспрезентацией IL-2. Таким образом, соединения, направленные (также) на высокоаффинный IL-2R $\alpha$  $\beta\gamma$ , потенциально приводят к размножению  $T_{reg}$  и синдрому утечки сосудов (СУС), как это наблюдается в случае нативного IL-2 или растворимого IL-15 (Conlon et al. 2019). Потенциально СУС также может быть вызван депегилированным NKTR-214. Однако депегилированный NKT2-214 имеет короткий период полувыведения, и в ходе клинической разработки еще предстоит выяснить, играет ли вообще, или в какой

степени играет, роль этот побочный эффект.

Высокоаффинные рецепторы ІІ-15 Rαβγ, активированные цис-презентацией ІІ-15, конститутивно экспрессируются при Т-клеточном лейкозе, и их экспрессия повышена на воспалительных NK-клетках, воспалительных CD8<sup>+</sup> Т-клетках и фибробластоподобных синовиоцитах (Kurowska et al. 2002, Perdreau et al. 2010), то есть, эти клетки также экспрессируют субъединицу IL-15Ra. Такую активацию следует избегать, поскольку циспрезентация IL-15 на этих клетках связана с развитием Т-клеточного лейкоза и усилением иммунного ответа, потенциально запускающим аутоиммунные заболевания. Аналогично, высокоаффинный рецептор IL-15Rαβγ экспрессируется на сосудистом эндотелии, и растворимый IL-15 также может индуцировать СУС. Комплексы IL-15/IL-15Ra не связываются с этим высокоаффинным рецептором, поскольку они уже несут по меньшей домен IL-15Rα, который стерически препятствует связыванию с мере sushi рецептором IL-15Rαβγ. Эти побочные эффекты, гетеротримерным связыванием высокоаффинных рецепторов IL-15Rαβγ, инициируются нативным IL-15, но также и нековалентными комплексами IL-15/IL-15Ra, такими как ALT-803 и hetIL-15, если in vivo происходит распад комплексов.

Наконец, высокоаффинный IL-15Rα конститутивно экспрессируется на миелоидных клетках, макрофагах, В-клетках и нейтрофилах (Chenoweth et al. 2012), и может быть активирован нативным IL-15 и опять-таки нековалентными комплексами IL-15/IL-15Rα, такими как ALT-803 и hetIL-15, если in vivo происходит распад комплексов.

Подводя итоги, IL-15 имеет иммуностимулирующие свойства, аналогичные свойствам IL-2, но считается, что он не обладает иммуносупрессорными активностями, такими как активация  $T_{reg}$  клеток, и не вызывает СУС в клинических условиях (Robinson and Schluns 2017), при этом недостатки лечения с использованием IL-15 включают его короткий период полувыведения in vivo и его зависимость от транс-презентации клетками других типов (Robinson and Schluns 2017). Это ведет к разработке сконструированных агонистов IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , некоторые из которых недавно вступили в стадию клинической разработки.

Хотя лечение высокими дозами IL-2 одобрено для почечноклеточного рака и метастатической меланомы (в дозе 600000 МЕ/кг, с в/в болюсным введением в течение 15 мин каждые 8 часов, максимально 14 доз, с последующими 9 днями отдыха перед повторением режима, в случае переносимости пациентом), IL-2 все еще продолжают исследовать с целью определения более низкой дозы, которая обеспечивает достаточную иммунную активацию с лучше переносимым профилем безопасности, например, инфузия в течение 90 дней в низкой дозе размноженных NK-клеток с промежуточным импульсным введением IL-2 для обеспечения активации пула размноженных NK-клеток, а также многие другие варианты с введением низких доз в/в или п/к, как правило, в сочетании с другими иммунотерапевтическими средствами, были оценены, но с неубедительными результатами (Conlon et al. 2019). Были исследованы режимы подкожного введения низких доз (1-30 миллионов МЕ/м²/сутки), поскольку они могут снижать токсичность, но

ставить под угрозу эффективность (Fyfe et al. 1995) и преимущественно активировать  $T_{reg}$ . Таким образом, IL-2 в низких дозах используют в иммуносупрессорных вариантах лечения (Rosenzwajg et al. 2019).

Соответственно, введение, дозирование и режимы дозирования спроектированных агонистов IL-2/IL-15Rβγ будут иметь ключевое значение для их клинического успеха, который определяется многочисленными факторами, например, связанными с эффективностью, побочными эффектами, соблюдением пациентом режима лечения и удобством, например, в сочетании с другими лекарственными средствами.

Недавно были опубликованы данные о фармакокинетике и фармакодинамике hetIL-15 у макак-резусов (Bergamaschi et al. 2018). hetIL-15 вводили п/к в фиксированных дозах 0,5, 5 или 50 мкг/кг в циклах дозирования с введением в дни 1, 3, 5, 8, 10 и 12 (цикл 1) и в дни 29, 31, 33, 36, 38 и 40 (цикл дозирования 2). Кроме того, обезьянам вводили препарат в режиме ступенчато удваиваемых доз, с инъекциями в дни 1, 3, 5, 8, 10 и 12 доз 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мкг/кг. В/в введение приводит к пиковым уровням IL-15 в плазме через 10 мин после инъекции, с периодом полувыведения 1,5 ч, в то время как п/к введение hetIL-15 приводило к  $T_{\frac{1}{2}}$  примерно 12 ч. Было показано, что как AUC, так и  $C_{max}$ , снижались в дни 1-40 при п/к введении фиксированной дозы, в 2 раза и 4 раза при фиксированной дозе 5 мкг/кг, и даже в 9 раз и 8 раз при фиксированной дозе 50 мкг/кг. Авторы пришли к выводу, что «потребление введенного hetIL-15 прогрессивно увеличивалось во время цикла лечения, отражая увеличение пула клеток, отвечающих на IL-15», и что «режим фиксированных доз обеспечил избыток IL-15 в начале 2-недельного цикла, но не достаточное количество цитокина позже в цикле лечения». Вследствие этого, авторы продолжали использовать схему введения, состоящую из 6 прогрессивно удваивающихся доз, от 2 до 64 мкг/кг, hetIL-15 в течение двух недель, что приводило к постепенному увеличению системной экспозиции и сопоставимым остаточным уровням, что в целом можно интерпретировать как лучшее соответствие растущей потребности в IL-15 со стороны увеличивающегося пула клеток-мишеней во время лечения. Что касается пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, авторы отметили, что при использовании режима введения фиксированных доз на 15-й день наблюдалось уменьшение количества пролиферирующих Кі67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как у макак, получавших лечение в режиме ступенчатых доз, наблюдалась высокая и сопоставимая пролиферация CD8<sup>+</sup> T-клеток в день 8 и 15.

В случае большинства разработанных агонистов IL-2/IL-15Rβγ целью является увеличение их іп vivo периода полувыведения, либо за счет слияния IL-15, IL-2, или их варианта, с другим белком, например, с растворимым IL-15Rα (hetIL-15, где образование комплекса с рецептором сопровождается значительным увеличением периода полувыведения), добавления Fc-фрагмента антитела к комплексу (ALT-803), либо слияния IL-15/IL-15Rα с Fc (P22339), как описано в US 10206980, и получения гетеродимерных слитых продуктов IL15/IL15Rα с Fc, имеющих более длительный период полувыведения (Вегпеtt et al. 2017) (WO 2014/145806), слияния с не связывающими IgG (IgG-IL2v) или с альбумин-связывающим доменом (смотри WO 2018/151868A2). Другими примерами

агонистов IL-2/IL-15Rβγ являются СТ101-IL2 (Ghasemi et al. 2016, Lazear et al. 2017), пегилированные молекулы IL-2 и NKTR-214 (Charych et al. 2016) и THOR-924 (Caffaro et al. 2019) (WO 2019/028419, WO 2019/028425), покрытый полимером IL-15 NKTR-255 (Міуаzакі et al. 2018), NL-201/NEO-201 (Silva et al. 2019), RGD-направленный комплекс IL-15/IL-15Rα c Fc (US 2019/0092830), RTX-240 от компании Rubius Therapeutics (эритроциты, экспрессирующие слитый белок IL-15/IL-15Rα, WO 2019/173798) и THOR-707 (Joseph et al. 2019). Кроме того, направленные агонисты IL-2/IL-15Rβγ, где агонист слит со связывающей молекулой, направленной на конкретные клетки, например, опухоль, микроокружение опухоли или иммунные клетки, имеют увеличенный период полувыведения in vivo (RG7813, RG7461, иммуноцитокины, описанные в WO 2012/175222A1, модулокины, описанные в WO 2015/018528A1, и KD033, описанный в Kadmon, WO 2015/109124).

Исследования показали, что ALT-803 имеет 7,5-часовой период полувыведения в сыворотке крови у мышей (Liu et al. 2018) и 7,2-8 ч у яванских макак (Rhode et al. 2016) в сравнении с <40 минут в случае IL-15 (Han et al. 2011). В клинике ALT-803 вводили в/в или п/к в фазе 1 испытания с эскалацией дозы еженедельно в течение 4 последовательных недель, с последующим 2-недельным периодом отдыха для постоянного мониторинга, всего два 6-недельных цикла терапии, начиная с 0,3 мкг/кг до 20 мкг/кг. Результаты испытания позволили выбрать дозу 20 мкг/кг, вводимую п/к еженедельно, в качестве оптимальной дозы и способа доставки для ALT-803 (Margolin et al. 2018).

NKTR-214 описывается как высоко «комбинируемый цитокин», вводимый скорее как антитело, чем как цитокин, из-за длительного периода полувыведения in vivo. Его предполагаемый режим дозирования у человека составляет один раз в 21 день. Тем не менее, NKTR-214 обеспечивает механизм прямой иммунной стимуляции, характерный для цитокинов. Пегилирование резко изменяет фармакокинетику NKTR-214 в сравнении с IL-2, обеспечивая 500-кратное увеличение AUC в опухоли в сравнении с эквивалентной дозой IL-2. Фармакокинетика NKTR-214 была определена после в/в введение мышам, и результаты показали, что концентрация наиболее активных форм NKTR-214 (то есть, 2-ПЭГ-IL2, 1-ПЭГ-IL2, свободного IL2) постепенно увеличивается, достигая С<sub>тах</sub> через 16 часов после введения дозы и уменьшается с t½ 17,6 часов (Charych et al. 2017). Исходя из увеличенного периода полувыведения вследствие пегилирования, NKTR-214 тестировали в пяти режимах дозирования в сочетании с ниволумабом в NCT02983045 (смотри www.clinicaltrials.gov)

- 0,006 мг/кг NKTR-214 каждые 3 недели (q3w) с 240 мг ниволумаба каждые две недели (q2w),
  - 0,003 мг/кг NKTR-214 q2w с 240 мг ниволумаба q2w,
  - 0,006 мг/кг NKTR-214 q2w с 240 мг ниволумаба q2w,
  - 0,006 мг/кг NKTR-214 q3w с 360 мг ниволумаба q3w,
  - 0,009 мг/кг NKTR-214 q3w с 360 мг ниволумаба q3w.

После завершения первой части исследования оно было продолжено с дозой 0,006

мг/кг NKTR-214 q3w с 360 мг ниволумаба q3w.

Недавно с помощью вычислительного подхода были разработаны миметики IL-2/IL-15, которые, по сообщениям, связываются с гетеродимером IL-2 $R\beta\gamma$ , но не имеют сайта связывания для IL-2 $R\alpha$  (Silva et al. 2019), и, таким образом, также квалифицируются как агонисты IL-2/IL-15R. Вследствие их небольшого размера примерно 15 кДа (смотри дополнительную информацию на Фигуре S13) ожидается, что они будут иметь довольно короткий период полувыведения in vivo.

Другим примером такого агониста IL-2/IL-15Rβγ на основе IL-2 является вариант IL-2 (IL2v) от компании Roche, который используют в слитых белках с антителами. RO687428, который является примером IL2v, вводят в клинике в/в

- в дни 1, 15, 29, и один раз в 2 недели с дня 29 и далее, с начальной дозой 5 мг и последующим ее увеличением, или по схеме q3w (смотри NCT03063762, www.clinicaltrials.gov),
  - один раз в неделю (qw) с начальной дозой 5 мг в качестве монотерапии,
  - с начальной дозой 5 мг qw в сочетании с цетуксимабом и
- с начальной дозой 10 мг qw в сочетании с трастузумабом (смотри NCT02627274, www.clinicaltrials.gov),

или в сочетании с атезолизумабом,

- qw для первых 4 доз, и один раз в 2 недели (q2w) для оставшихся доз в течение максимум 36 месяцев, начиная с первой дозы 10 мг, и 15 мг для второй и последующих доз,
- qw для первых 4 доз и q2w для оставшихся доз в течение максимум 36 месяцев, с начальной дозой 10 мг и 15 мг для второй и последующих доз,
  - q3w в течение максимум 36 месяцев с дозой 10 мг,
- qw в течение 4 недель, а затем q2w, с начальной дозой  $15~\rm mr$  и  $20~\rm mr$ , начиная со второго введения и далее, или
  - q3w с дозой 15 мг (смотри NCT03386721, www.clinicaltrials.gov).

Таблица 1: In vivo полураспад агонистов IL-15 и IL-2/IL-15RBy

	$T^{1/_{2}}$ , $n/\kappa$ мышам	$T^{1\!/_{\!2}}$ для человека	Оптимизированное	
			введение человеку	
IL-15	<40 мин	Т <sub>тах</sub> 4 ч после	п/к в дни 1-8 и 22-29,	NCT03388632
(rhIL-15)		n/κ	или	NCT01572493
		болюс в/в	в/в непрерывная	NCT01021059
		Т½=2,7 ч	инфузия в течение 5	(Han et al.
			или 10	2011)
			последовательных	(Miller et al.
			дней, или	2018)
			в/в ежедневно в	(Conlon et al.

			течение 12	2015)
			последовательных	
			дней	
ALT-803	7,5 ч для в/в	п/к >96 ч, но не	20 мкг/кг п/к qw	(Romee et al.
	против 7,7 ч	в/в		2018)
	для п/к	Стах через 6 ч,		(Wrangle et al.
		все еще		2018)
		обнаруживается		
		через 24 ч		
hetIL-15,	~12 ч		6 прогрессивно	(Bergamaschi et
NIZ985			удваивающихся доз	al. 2018)
			от 2 до 64 мкг/кг в	(Conlon et al.
			течение 2 недель	2019)
			1 мкг/кг (3х в	
			неделю; 2 недели	
			плюс/2 недели	
			минус)	
RLI-15	3,5 ч	H/O	Еще не тестировано	
	(собственные			
	данные)			
NKT-214	несколько дней	T½ 20 ч, С <sub>тах</sub> 1-2	6 мкг/кг в/в q3w	(Charych et al.
		дня после дозы		2017)
				(Bentebibel et
				al. 2017)
NKTR-	17,6 ч			(Charych et al.
214				2017)
наиболее				
активная				
форма				
RO687428			≥5 мг в/в qw или q3w	NCT03386721

Однако даже менее чем 15-мин воздействие IL-15 (в дозе 10 нг/мл) на клетки, экспрессирующие рецептор для нативного IL-15, приводит к максимальному уровню активации Stat5 и последующим фармакодинамическим эффектам (Castro et al. 2011).

В целом, в настоящее время агонисты IL-2/IL-15Rβγ вводят для достижения постоянной доступности молекулы в организме пациента либо непрерывной инфузией

короткоживущих молекул, либо резко увеличивая период полувыведения агонистов IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  за счет пегилирования или слияния с Fc-фрагментами или антителами. Это соответствует общему пониманию того, что как направленность на опухоль, так и in vivo противоопухолевая активность, NK-клеток зависят от постоянного наличия IL-2 или IL-15, поскольку, если NK-клетки не стимулируются часто IL-15, они быстро погибают (Larsen et al. 2014). Кроме того, такие методы лечения в значительной степени направлены на максимизацию размножения CD8<sup>+</sup> T-клеток, при этом с попыткой минимизации размножения  $T_{reg}$  (Charych et al. 2013).

С другой стороны, Frutoso et al. показали на мышах, что два цикла инъекций агонистов IL-15 или IL-15 приводили к слабому, или даже не приводили к, размножению NK-клеток in vivo у иммунокомпетентных мышей, в то время как CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки были все еще способными к ответу после второго цикла стимуляции IL-15 или его агонистами (Frutoso et al. 2018). Увеличение дозы для второго цикла не привело к заметной разнице. Более того, NK-клетки, извлеченные из мышей после двух циклов стимуляции, демонстрировали более низкую секрецию IFN-у в сравнении с клетками после одного цикла, которая была эквивалентна таковой у не подвергнутых воздействию мышей (Frutoso et al. 2018). Это явление можно объяснить результатами исследований, согласно которым длительная стимуляция NK-клеток сильным сигналом активации приводит к преимущественному накоплению зрелых NK-клеток с измененной активацией и сниженной функциональной способностью (Elpek et al. 2010). Аналогично, было описано, что непрерывное введение IL-15 истощает NK-клетки человека, и этот эффект был рассмотрен в контексте влияния окисления жирных кислот на активность NK-клеток, что позволяет предположить, что индукция окисления жирных кислот может значительно повышать эффективность NK-клеточной иммунотерапии, опосредованной IL-15 (Felices et al. 2018).

Таким образом, несмотря на недавние успехи в понимании функции агонистов IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , до сих пор неясно, как такие агонисты IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  оптимально дозировать и интегрировать в режимы лечения в качестве единственного средства или в сочетании с другими терапевтическими средствами.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения с удивлением обнаружили, что импульсное циклическое дозирование, а также импульсное дозирование агониста рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL- $15R\beta\gamma$ ) у приматов приводит к оптимальной активации NK и CD8<sup>+</sup> T-клеток, то есть, что введение агониста IL-2/IL- $15R\beta\gamma$  приводит к заметному увеличению количества Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток и/или увеличению количества NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток, что повторяется/поддерживается в течение нескольких раундов введения.

Соответственно, настоящее изобретение относится к новым импульсным циклическим режимам введения и импульсным режимам введения для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний у человека с

использованием агонистов IL-2/IL-15Rβγ.

#### Определения, сокращения и акронимы

«Агонист IL-2/IL-15Rβу» означает комплекс из IL-2 или производного IL-2, или IL-15 или производного IL-15, направленный на среднеаффинный IL-2/IL-15Rβγ и отличающийся меньшим, или отсутствующим, связыванием IL-2Ra или IL-15Ra. Меньшее связывание в данном контексте означает уменьшенное на по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 80% и, в частности, по меньшей мере 90%, связывание с соответствующим рецептором а в сравнении с IL-15 или IL-2 дикого типа, соответственно. Как описано и показано ниже, меньшее или отсутствующее связывание IL-15 с соответствующим IL-15Ra может быть опосредовано образованием комплекса (ковалентного или нековалентного) с производным IL-15Ra, мутациями в IL-15, приводящими к меньшему или отсутствующему связыванию, либо сайт-специфическим пегилированием или другими посттрансляционными модификациями IL-15, приводящими к меньшему или отсутствующему связыванию. Аналогично, меньшее или отсутствующее связывание IL-2 с соответствующим IL-2Ra может быть опосредовано мутациями в IL-2, приводящими к меньшему или отсутствующему связыванию, либо сайт-специфическим пегилированием или другими посттрансляционными модификациями IL-2, приводящими к меньшему или отсутствующему связыванию.

Используемые в настоящем документе термины «интерлейкин-2», «IL-2» или «IL2» означают человеческий цитокин, последовательность которого в базе данных NCBI имеет регистрационный номер AAB46883.1 или UniProt ID P60568 (SEQ ID NO: 1). Его белок-предшественник имеет 153 аминокислоты, с 20-ак пептидным лидером, результатом его процессинга является 133-ак зрелый белок. Его мРНК в базе данных NCBI имеет GenBank регистрационный номер S82692.1.

Используемый в настоящем документе термин «производное IL-2» означает белок, имеющий процент идентичности по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью зрелого человеческого IL-2 (SEQ ID NO: 2). Предпочтительно, производное IL-2 имеет по меньшей мере примерно 0,1% активности человеческого ІС-2, предпочтительно по меньшей мере 1%, более предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 25%, даже более предпочтительно по меньшей мере 50%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, при определении в биоанализе пролиферации лимфоцитов. Поскольку интерлейкины являются чрезвычайно мощными молекулами, даже такие низкие активности, как 0,1% от активности человеческого IL-2, могут быть достаточно сильными, особенно в случае более высокой дозировки, или если увеличенный период полувыведения компенсирует потерю активности. Его активность выражают в международных единицах, как установлено для интерлейкина-2 (человека) 1-м Международным стандартом Всемирной организации здравоохранения, замененным 2-м Международным стандартом (Gearing and Thorpe 1988, Wadhwa et al. 2013). Взаимосвязь

между активностью и массой белка является следующей: 18 миллионов МЕ пролейкина=1,1 мг белка. Как описано выше, можно вводить мутации (замены) для специфического связывания ПЭГ с IL-2 с целью увеличения периода полувыведения, как это было сделано для THOR-707 (Joseph et al. 2019) (WO2019/028419A1), или для модификации связывающих свойств молекулы, например, уменьшения связывания с рецептором IL-2α, как это было сделано для IL2v (Klein et al. 2013, Bacac et al. 2016) (WO 2012/107417A1) за счет мутаций L72, F42 и/или Y45, в частности, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K, предпочтительно мутаций F42A, Y45A и L72G. Описаны и различные другие мутации IL-2: R38W для снижения токсичности (Hu et al. 2003) за счет снижения проницаемости сосудов (US 2003/0124678); N88R для повышения избирательности для Т-клеток в сравнении с NK-клетками (Shanafelt et al. 2000); R38A и F42K для снижения секреции провоспалительных цитокинов из NK-клеток ((Heaton et al. 1993) (US 5229109); D20T, N88R и Q126D для снижения СУС (US 2007/0036752); R38W и F42K для уменьшения взаимодействия с CD25 и активации T<sub>reg</sub> клеток с целью повышения эффективности (WO 2008/003473); а также можно вводить дополнительные мутации, такие как ТЗА, с целью избегания агрегации и C125A для устранения О-гликозилирования (Klein et al. 2017). Другие мутации или их комбинации могут быть созданы методами генной инженерии и хорошо известны в данной области. Номера аминокислот относятся к последовательности зрелого IL-2, состоящей из 133 аминокислот.

Используемые в настоящем документе термины «интерлейкин-15», «IL-15» или «IL15» означают человеческий цитокин, последовательность которого в базе данных NCBI имеет регистрационный номер NP\_000576.1 или UniProt ID P40933 (SEQ ID NO: 3). Его белок-предшественник имеет 162 аминокислоты, с длинным 48-ак пептидным лидером, результатом его процессинга является 114-ак зрелый белок (SEQ ID NO: 4). Его мРНК, полная кодирующая последовательность, в базе данных NCBI имеет GenBank регистрационный номер U14407.1. Sushi домен IL-15Rα (или IL-15Rα<sub>sushi</sub>, SEQ ID NO: 6) представляет собой домен IL-15Rα, который необходим для связывания с IL-15.

Используемый в настоящем документе термин «производное IL-15», или «производное от IL-15», означает белок, имеющий процент идентичности по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью зрелого человеческого IL-15 (114 ак) (SEQ ID NO: 4). Предпочтительно, производное IL-15 имеет по меньшей мере 10% активности IL-15, более предпочтительно по меньшей мере 25%, даже более предпочтительно по меньшей мере 50%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%. Более предпочтительно, производное IL-15 имеет по меньшей мере 0,1% активности человеческого IL-15, предпочтительно 1%, более предпочтительно по меньшей мере 10%, более

50%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%. Как и в случае IL-2, описанного выше, интерлейкины являются чрезвычайно мощными молекулами, даже такие низкие активности, как 0,1% от активности человеческого IL-15, могут быть достаточно сильными, особенно в случае более высокой дозировки, или если увеличенный период полувыведения компенсирует потерю активности. Для ІС-15 также описано множество мутаций для достижения различных определенных изменений молекулы: D8N, D8A, D61A, N65D, N65A, Q108R для уменьшения связывания с рецепторами IL-15Rβγβγ<sub>c</sub> (WO 2008/143794A1); N72D в качестве активирующей мутации (в ALT-803); N1D, N4D, D8N, D30N, D61N, E64Q, N65D и Q108E для снижения пролиферативной активности (US 2018/0118805); L44D, E46K, L47D, V49D, I50D, L66D, L66E, I67D и I67E для уменьшения связывания с IL-15Ra (WO 2016/142314A1); N65K и L69R для устранения связывания IL-15Rb (WO 2014/207173A1); Q101D и Q108D для ингибирования функции IL-15 (WO 2006/020849A2); S7Y, S7A, K10A, K11A для уменьшения связывания IL-15Rβ (Ring et al. 2012); L45, S51, L52 с заменой на D, E, K, или R и E64, I68, L69 и N65 с заменой на D, E, R или К для увеличения связывания с IL-15Ra (WO 2005/085282A1); замена N71 на S, А или N, N72 на S, A или N, N77 на Q, S, K, A или E и N78 на S, A или G для уменьшения дезамидирования (WO 2009/135031A1); в WO 2016/060996A2 определены конкретные области IL-15, подходящие для замены (смотри параграф 0020, 0035, 00120 и 00130), и, в частности, предоставлено руководство по определению потенциальных замен для обеспечения якоря для ПЭГ или других модификаций (смотри параграф 0021); Q108D для повышения аффинности для CD122 и нарушения рекрутинга CD132 с целью ингибирования эффекторных функций IL-2 и IL-15, и N65K для устранения аффинности к CD122 (WO 2017/046200A1); N1D, N4D, D8N, D30N, D61N, E64Q, N65D и Q108E для постепенного снижения активности соответствующего комплекса IL-15/IL-15Ra в отношении активации NK-клеток и CD8 Т-клеток (смотри Фиг. 51, WO 2018/071918A1, WO 2018/071919A1). Дополнительно или альтернативно, специалист в данной области сможет с легкостью производить консервативные аминокислотные замены.

Активность как IL-2, так и IL-15, можно определять путем индукции пролиферации клеток kit225, как описано в публикации Hori et al. (1987). Предпочтительно, используют такие методы, как колориметрия или флуоресценция, для определения активации пролиферации вследствие стимуляции IL-2 или IL-15, например, как описано в публикации Soman et al. с использованием клеток CTLL-2 (Soman et al. 2009). В качестве альтернативы линиям клеток, таким как клетки kit225, можно использовать человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) или лейкоцитарные пленки. Предпочтительный биоанализ для определения активности IL-2 или IL-15 можно проводить при помощи набора для биоанализа IL-2/IL-15, с использованием STAT5-RE клеток CTLL-2 (Promega, каталожный номер CS2018B03/B07/B05).

Мутеины IL-15 могут быть получены стандартными методами генной инженерии и хорошо известны в данной области, например, описаны в WO 2005/085282, US 2006/0057680, WO 2008/143794, WO 2009/135031, WO 2014/207173, WO 2016/142314, WO

2016/060996, WO 2017/046200, WO 2018/071918, WO 2018/071919, US 2018/0118805. Производные IL-15 могут быть дополнительно получены путем химической модификации, как известно в данной области, например, путем пегилирования или других посттрансляционных модификаций (смотри WO 2017/112528A2, WO 2009/135031).

Используемый в настоящем документе термин «IL-2R $\alpha$ » означает человеческий рецептор  $\alpha$  IL-2 или CD25.

Используемый в настоящем документе термин «IL-15R $\alpha$ » означает человеческий рецептор  $\alpha$  IL-15 или CD215, последовательность которого в базе данных NCBI имеет регистрационный номер AAI21142.1 или UniProt ID Q13261 (SEQ ID NO: 5). Его белокпредшественник имеет 267 аминокислот, с 30-ак пептидным лидером, результатом его процессинга является 231-ак зрелый белок. Его мРНК в базе данных NCBI имеет GenBank регистрационный номер HQ401283.1. Sushi домен IL-15R $\alpha$  (или IL-15R $\alpha$ sushi, SEQ ID NO: 6) представляет собой домен IL-15R $\alpha$ , который необходим для связывания с IL-15 (Wei et al. 2001). Фрагмент sushi+ (SEQ ID NO: 7) содержит sushi домен и часть шарнирной области, которую определяют как четырнадцать аминокислот, расположенных после sushi домена этого IL-15R $\alpha$  в С-концевом положении относительно указанного sushi домена, то есть, указанная шарнирная область IL-15R $\alpha$  начинается с первой аминокислоты после указанного (C4) остатка цистеина и заканчивается на четырнадцатой аминокислоте (считая в стандартной ориентации «от N-конца к C-концу»). Фрагмент sushi+ восстанавливает полную активность связывания с IL-15 (WO 2007/046006).

Используемый в настоящем документе термин «рецептор  $\alpha$ » относится к IL-2R $\alpha$  или IL-15R $\alpha$ .

Используемый в настоящем документе термин «производное IL-15Ra» означает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую процент идентичности по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, даже более предпочтительно по меньшей мере 99%, 100% наиболее предпочтительно идентичность аминокислотной c последовательностью sushi домена человеческого IL-15Ra (SEQ ID NO: 6) и, предпочтительно sushi+ домена человеческого IL-15Rα (SEQ ID NO: 7). Предпочтительно, производное IL-15Ra представляет собой укороченный с N- и C-конца полипептид, при этом сигнальный пептид (аминокислоты 1-30 в SEQ ID NO: 5) делетированы, и IL-15Rα трансмембранный домен И цитоплазматическая часть делетированы (аминокислоты 210-267 в SEQ ID NO: 5). Соответственно, предпочтительные производные IL-15Rα содержат по меньшей мере sushi домен (ак 33-93), но не выходят за пределы внеклеточной части зрелого IL-15Ra, представляющей собой аминокислоты 31-209 в SEQ ID NO: 5. Конкретными предпочтительными производными IL-15Rα являются sushi домен IL-15Rα (SEQ ID NO: 6), sushi+ домен IL-15Rα (SEQ ID NO: 7) и растворимая форма IL-15Rα (от аминокислоты 31 до любой из аминокислот 172, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 или 205 в SEQ ID NO: 5, смотри WO 2014/066527, (Giron-Michel et al. 2005)). В пределах, предусмотренных данным определением, производное IL-15Rα может иметь естественные или искусственно введенные мутации. Естественные варианты и альтернативные последовательности описаны, например, в UniProtKB записи данных Q13261 (https://www.uniprot.org/uniprot/Q13261). Кроме того, специалист в данной области может с легкостью определять менее консервативные аминокислоты в гомологах IL-15Rα млекопитающих, или даже гомологах IL-15Rα приматов, для получения производных, которые все еще являются функциональными. Соответствующие последовательности гомологов IL-15Rα млекопитающих описаны в WO 2007/046006, страницы 18 и 19. Дополнительно или альтернативно, специалист в данной области может с легкостью производить консервативные аминокислотные замены.

Предпочтительно, производное IL-15R $\alpha$  имеет по меньшей мере 10% связывающей активности человеческого sushi домена с человеческим IL-15, например, как описано в (Wei et al. 2001), более предпочтительно по меньшей мере 25%, даже более предпочтительно по меньшей мере 50%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%.

«IL-2Rβ» означает человеческий IL-Rβ или CD122.

«IL-2R $\gamma$ » означает общую для рецепторов цитокинов  $\gamma$  или  $\gamma_c$ , или CD132, общую для рецепторов IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21.

«RLI-15» означает комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$ , представляющий собой слитый белок рецептор-линкер-интерлейкин из sushi+ фрагмента человеческого IL-15R $\alpha$  с человеческим IL-15. Подходящие линкеры описаны в WO 2007/046006 и WO 2012/175222.

«RLI2» или «SO-C101» означают конкретные варианты RLI-15 и относятся к комплексу IL-15/IL-15R $\alpha$ , представляющему собой слитый белок рецептор-линкер-интерлейкин из sushi+ фрагмента человеческого IL-15R $\alpha$  с человеческим IL-15 (SEQ ID NO: 9), с использованием линкера, имеющего последовательность SEQ ID NO: 8.

«ALT-803» означает комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  от компании Altor BioScience Corp., который представляет собой комплекс, содержащий 2 молекулы оптимизированного заменой аминокислот (N72D) «суперагониста» человеческого IL-15, 2 молекулы «sushi» домена человеческого рецептора IL-15 $\alpha$ , слитого с димерным человеческим Fc-фрагментом IgG1, который придает стабильность и увеличивает время полувыведения комплекса IL-15 $_{\rm N72D}$ :IL-15R $\alpha_{\rm sushi}$ -Fc (смотри, например, US 2017/0088597).

«Гетеродимерный IL-15:IL-R $\alpha$ », «hetIL-15» или «NIZ985» означают комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  от компании Novartis, напоминающий IL-15, который циркулирует в виде стабильного молекулярного комплекса с растворимым IL-15R $\alpha$  и представляет собой рекомбинантно совместно экспрессируемый нековалентный комплекс из человеческого IL-15 и растворимого человеческого IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ), то есть, 170 аминокислот IL-15R $\alpha$  без сигнального пептида, а также трансмембранный и цитоплазматический домен (Thaysen-Andersen et al. 2016, смотри, например, таблицу 1).

Используемый в настоящем документе термин «агонисты IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$ » означает молекулы или комплексы, которые в основном направлены на среднеаффинный рецептор IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  без связывания с рецептором IL-2 $R\alpha$  и/или IL-15 $R\alpha$ , и вследствие этого, не

стимулирующие  $T_{reg}$ . Примерами являются IL-15, связанный по меньшей мере с sushi доменом IL-15R $\alpha$ , обладающий преимуществом независимости от транс-презентации или межклеточного взаимодействия, а также более длительного периода полувыведения in vivo вследствие увеличенного размера молекулы, который, как показано, является значительно более активным, чем природный IL-15 in vitro и in vivo (Robinson and Schluns 2017). Помимо комплексов на основе IL-15/IL-15R $\alpha$ , это может быть достигнуто за счет мутантного или химически модифицированного IL-2, который отличается заметно сниженным или отсроченным по времени связыванием с рецептором IL-2 $\alpha$ , без влияния на связывание с рецептором IL-2/15R $\beta$  и  $\gamma_{\rm C}$ .

«NKTR-214» означает агонист IL-2/IL-15Rβγ на основе IL-2, который представляет собой биологическое пролекарство, состоящее из ІС-2, связанного 6 высвобождаемыми цепями полиэтиленгликоля (ПЭГ) (WO 2012/065086A1). Наличие нескольких цепей ПЭГ создает неактивное пролекарство, что предотвращает быструю системную иммунную активацию при введении. Использование высвобождаемых линкеров позволяет цепям ПЭГ образованием медленно гидролизоваться, c непрерывным активного конъюгированного IL-2, связанного 2-ПЭГ или 1-ПЭГ. Расположение цепей ПЭГ на стыке IL-2/IL-2Rα препятствует связыванию с высокоаффинным IL-2Rα, при этом не меняя связывание с низкоаффинным IL-2RB, что способствует иммунной активации, а не супрессии в опухоли (Charych et al. 2016, Charych et al. 2017).

«IL2v» означает агонист IL-2/IL-15Rβγ на основе IL-2 от компании Roche, который представляет собой вариант IL-2 без связывания с субъединицей IL-2Ra, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10. IL2v используют, например, в слитых белках, слитым с С-концом антитела. IL2v был спроектирован путем устранения способности к связыванию с IL-2Ra за счет аминокислотных замен F42A, Y45A и L72G (консервативных в белках человека, мыши и приматов), а также путем устранения О-гликозилирования за счет аминокислотной замены ТЗА и устранения агрегации за счет мутации С125А, аналогично альдеслейкину (нумерация на основе UniProt ID P60568 за исключением сигнального пептида) (Klein et al. 2017). IL2v используют в качестве партнера при слиянии с антителами, например, с ненаправленным IgG (IgG-IL2v), с целью увеличения его периода полувыведения (Bacac et al. 2017). В RG7813 (или цергутузумаб RO-6895882, CEA-IL2v) IL2v амуналейкине, слит С направленным карциноэмбриональный антиген (СЕА) антителом с гетеродимерным Fc-фрагментом, лишенным связывания с FcγR и C1q (Klein 2014, Bacac et al. 2016, Klein et al. 2017). И в RG7461 (или RO6874281, или FAP-IL2v) IL2v слит с опухоль-специфическим антителом, направленным на белок-альфа активации фибробластов (FAP) (Klein 2014).

«ТНОR-707» означает агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на основе формы IL-2 с сайтнаправленным одиночным пегилированием, отличающийся меньшим/отсутствующим связыванием цепи IL2R $\alpha$ , при этом с сохранением связывания с среднеаффинным сигнальным комплексом IL-2R $\beta\gamma$  (Joseph et al. 2019) (WO 2019/028419A1).

«NL-201» означает агонист IL-2/IL-15Rβγ, который представляет собой

спроектированный вычислительными методами белок, имитирующий IL-2, для связывания с гетеродимером рецептора  $\beta\gamma_c$  IL-2 (IL-2R $\beta\gamma_c$ ), но не имеющий сайта связывания для IL-2R $\alpha$  или IL-15R $\alpha$  (Silva et al. 2019).

«NKRT-255» означает агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на основе ПЭГ-конъюгированного человеческого IL-15, который сохраняет аффинность связывания с IL-15R $\alpha$  и имеет сниженный клиренс для обеспечения устойчивого фармакодинамического ответа (WO 2018/213341A1).

«ТНОR-924, -908, -918» означает агонисты IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на основе ПЭГ-конъюгированного IL-15 с пониженным связыванием с IL-15R $\alpha$ , с неприродной аминокислотой, используемой для сайт-специфического пегилирования (WO 2019/165453A1).

«Процент идентичности» между двумя аминокислотными последовательностями означает процент идентичных аминокислот в двух сравниваемых последовательностях, полученный путем наилучшего выравнивания указанных последовательностей, этот процент является чисто статистическим, И различия между ЭТИМИ двумя последовательностями случайным образом распределены по длине аминокислотных последовательностей. Используемый в настоящем документе термин «наилучшее выравнивание», или «оптимальное выравнивание», означает выравнивание, для которого определенный процент идентичности (смотри ниже) является самым высоким. Сравнение последовательностей для двух аминокислотных последовательностей обычно выполняют путем сравнения этих последовательностей, которые ранее были выровнены в соответствии с наилучшим выравниванием; это сравнение выполняют на сегментах сравнения с целью выявления и сравнения локальных областей сходства. Наилучшее выравнивание последовательностей для проведения сравнения можно выполнять, помимо ручного способа, с использованием алгоритма глобальной гомологии, разработанного Смитом и Уотерманом (1981), с использованием алгоритма локальной гомологии, разработанного Нидлманом и Вуншем (1970), с помощью метода поиска подобия, разработанного Пирсоном и Липманом (1988), с помощью компьютерных программ, использующих такие алгоритмы (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA), с помощью алгоритмов множественного выравнивания MUSCLE (Edgar 2004), или с использованием CLUSTAL (Goujon et al. 2010). Для получения наилучшего локального выравнивания предпочтительно использовать программу BLAST с матрицей **BLOSUM** 62. Процент аминокислотными идентичности между двумя последовательностями определяют путем сравнения этих двух последовательностей, оптимально выровненных, причем аминокислотные последовательности могут включать добавления или делеции относительно эталонной последовательности для достижения оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Процент идентичности рассчитывают путем определения числа идентичных положений в этих последовательностях и деления этого числа на общее число сравниваемых положений, с

последующим умножением полученного результата на 100 для получения процента идентичности между этими двумя последовательностями.

Используемый в настоящем документе термин «консервативные аминокислотные замены» означает замену аминокислот, при которой алифатическую аминокислоту (то есть, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин) заменяют другой алифатической аминокислотой, содержащую гидроксил или серу/селен аминокислоту (то есть, серин, цистеин, селеноцистеин, треонин, метионин) заменяют другой содержащей гидроксил или серу/селен аминокислотой, ароматическую аминокислоту (например, фенилаланин, тирозин, триптофан) заменяют другой ароматической аминокислотой, основную аминокислоту (то есть, гистидин, лизин, аргинин) заменяют другой основной аминокислотой, или кислую аминокислоту, или ее амид (аспартат, глутамат, аспарагин, глутамин), заменяют другой кислой аминокислотой, или ее амидом.

Используемый в настоящем документе термин «период полувыведения in vivo», или «Т½», означает время, необходимое для уменьшения количества лекарственного средства до половины его первоначального количества in vivo. Период полувыведения in vivo конкретного лекарственного средства можно определять у любого млекопитающего. Например, период полувыведения in vivo можно определять у человека, приматов или мышей. При том, что период полувыведения in vivo, определяемый у человека, может значительно отличаться от периода полувыведения in vivo у мышей, то есть, период полувыведения in vivo у мышей для определенного лекарственного средства обычно более короткий, чем период полувыведения in vivo, определяемый для того же лекарственного средства у человека, такой период полувыведения in vivo, определяемый у мышей, все же дает информацию об определенном периоде полувыведения in vivo у человека. Таким образом, на основании периода полувыведения in vivo, определяемого для конкретного лекарственного средства у мышей, можно экстраполировать период полувыведения in vivo для лекарственного средства у человека. Это особенно важно, поскольку прямое определение периода полувыведения in vivo для конкретного лекарственного средства у человека редко возможно вследствие запретов на проведение экспериментов на людях в чисто научных целях. Альтернативно, период полувыведения можно определять у приматов (например, яванских макак), он имеет больше сходства с периодом полувыведения у человека. Более конкретно, «период полувыведения in vivo», (конечный) период полувыведения в плазме, или Т1/2, означает период половинной элиминации или период половины конечной фазы, то есть, после введения период полувыведения in vivo представляет собой время, необходимое для уменьшения концентрации в плазме/крови на 50% после достижения псевдоравновесия распределения (Toutain and Bousquet-Melou 2004). Определение лекарственного средства, в данном случае агониста IL-2/IL-15βγ, который представляет собой полипептид, в крови/плазме, как правило, выполняют методом специфического для полипептида анализа ELISA.

Термин «ингибитор иммунных контрольных точек», или сокращенно «ингибитор контрольных точек», относится к лекарственному средству, которое блокирует

определенные белки, продуцируемые некоторыми видами клеток иммунной системы, такими как Т-клетки, и некоторыми раковыми клетками. Эти белки помогают держать иммунные ответы под контролем и способны удерживать Т-клетки от уничтожения раковых клеток. Когда эти белки блокированы, «тормоза» иммунной системы отпущены, и Т-клетки способны лучше уничтожать раковые клетки. Ингибиторы контрольных точек, соответственно, являются антагонистами ингибирующих иммунную систему молекул контрольных точек или антагонистами агонистических лигандов ингибирующих молекул контрольных точек. Примеры белков контрольных точек, встречающихся на Т-клетках или раковых клетках, включают PD-1/PD-L1 и CTLA-4/B7-1/B7-2 (определение Национального института рака при Национальном институте здравоохранения, смотри https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immune-checkpointinhibitor), обзор можно найти, например, в публикации Darvin et al. (2018). Примерами таких ингибиторов контрольных точек являются анти-PD-L1 антитела, анти-PD-1 антитела, анти-CTLA-4 антитела, а также антитела против LAG-3 или TIM-3, или блокатор BTLA, в настоящее время проходящий испытания в клинике (De Sousa Linhares et al. 2018). Также перспективными ингибиторами контрольных точек являются анти-TIGIT антитела (Solomon and Garrido-Laguna 2018).

«Анти-PD-L1 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее PD-L1. Примерами являются авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, KN035, MGD013 (биспецифическое для PD-1 и LAG-3).

«Анти-PD-1 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее PD-1. Примерами являются пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб (REGN2810), BMS-936558, SHR1210, IBI308, PDR001, BGB-A317, BCD-100, JS001.

«Анти-PD-L2 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее PD-L2. Примером является sHIgM12.

«Анти-CTLA4 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее CTLA-4. Примерами являются ипилимумаб и тремелимумаб (тицилимумаб).

«Анти-LAG-3» антитело означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее LAG-3. Примерами анти-LAG-3 антител являются релатлимаб (BMS 986016), Sym022, REGN3767, TSR-033, GSK2831781, MGD013 (биспецифическое для PD-1 и LAG-3), LAG525 (IMP701).

«Анти-ТІМ-3 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее ТІМ-3. Примерами являются TSR-022 и Sym023.

«Анти-TIGIT антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее TIGIT. Примерами являются тираголумаб (MTIG7192A, RG6058) и этигилимаб (WO 2018/102536).

«Терапевтическое антитело», или «направленное на опухоль антитело», означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое оказывает прямое терапевтическое воздействие на опухолевые клетки за счет связывания антитела с

мишенью, экспрессируемой на поверхности подвергаемой лечению опухолевой клетки. Такая терапевтическая активность может быть следствием связывания рецептора, приводящего к измененной сигнализации в клетке, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или другого опосредованного антителом уничтожения опухолевых клеток.

«Анти-CD38 антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее CD38, также известный как гидролаза циклической АД $\Phi$ -рибозы. Примерами анти-CD38 антител являются даратумумаб, изатуксимаб (SAR650984), MOR-202 (MOR03087), TAK-573 или TAK-079 (Abramson 2018) или GEN1029 (HexaBody  $^{\$}$ -DR5/DR5).

Термин «примерно», используемый в сочетании с величиной, означает величину плюс/минус 10%, предпочтительно 5%, и в частности, 1% от данной величины.

Термин «включающий», при использовании в настоящем описании и формуле изобретения, не исключает другие элементы. Для целей настоящего изобретения термин «состоящий из» считается предпочтительным вариантом осуществления термина «включающий». Если далее в настоящем документе группу определяют как включающую по меньшей мере определенное количество вариантов осуществления, это также следует понимать как описание группы, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления.

Форма единственного числа терминов включает соответствующую форму множественного числа этих терминов, если нет конкретных иных указаний.

Термин «по меньшей мере один», например, «по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство», может означать, что подразумевают одно или более химиотерапевтических средств. Термин «их сочетания» в том же контексте означает сочетание, включающее более одного химиотерапевтического средства.

Технические термины использованы в их общепринятом смысле. Если определенным терминам придается конкретный смысл, определения терминов будут приведены далее, в контексте, в котором эти термины использованы.

«qxw», от латинского quaque/каждый, каждый в каждую х неделю, например, q2w в каждую вторую неделю.

«п/к» - подкожно.

«в/в» - внутривенно.

«в/б» - внутрибрюшинно.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

# Импульсное циклическое дозирование

В первом аспекте настоящее изобретение относится к агонисту рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:

- (а) первый период из х дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение у последовательных дней в начале первого периода, затем в течение х-у дней агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  не вводят, где х составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день, предпочтительно, 7 или 14 дней, и у составляет 2, 3 или 4 дня, предпочтительно 2 или 3 дня;
  - (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и
  - (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,

где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 или 70 дней, предпочтительно 7, 14, 21 или 56 дней, более предпочтительно 7 дней или 21 день. Для иллюстрации, графическое изображение дозирования представлено на Фигуре 21. В более предпочтительном варианте осуществления у составляет 2 дня и х составляет 7 дней.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к агонисту рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:

- (а) первый период из х дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение у последовательных дней в начале первого периода, затем в течение х-у дней агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  не вводят, где х составляет 14 дней или 21 день, предпочтительно 14 дней, и у составляет 2, 3 или 4 дня, предпочтительно 2 или 3 дня;
  - (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и
  - (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,

где z составляет 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 или 70 дней, предпочтительно 7, 14, 21 или 56 дней, более предпочтительно 7 дней или 21 день. В более предпочтительном варианте осуществления x составляет 14 дней, y составляет 2, 3 или 4 дня и z составляет 14 дней. В частности, в случае более длительного импульсного введения в течение 4 дней может потребоваться, чтобы первый период из x дней продолжался более 7 дней, то есть, оставаться в недельной схеме 14 дней или 21 день.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к агонисту рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:

- (а) первый период из х дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение у последовательных дней в начале первого периода, затем в течение x-у дней агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  не вводят, где х составляет 5, 6, 7, 8 или 9 дней, и у составляет 2, 3 или 4 дня;
  - (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и

(c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней. Для иллюстрации, графическое изображение дозирования представлено на Фигуре 21.

Данная схема введения может быть описана как «импульсное циклическое» дозирование - «импульсное», поскольку агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят, например, в день 1 и день 2 недели для активации и размножения как NK, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток («импульс»), затем не вводят агонист до конца недели (этап (а)). Это плюс/минус введение повторяют по меньшей мере один раз, например, в течение двух или трех недель (этап (b)), затем следует другой период без введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , например, другая неделя (этап (с)). Соответственно, примерами цикла являются (а)-(а)-(с) ((а) повторяют один раз) или (а)-(а)-(с) ((а) повторяют два раза). Импульсное дозирование имеет место в первом периоде на этапе (а) и при повторении первого периода на этапе (b). Этапы (а), (b) и (с) совместно, то есть, импульсное дозирование в сочетании со вторым периодом без введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , называют одним циклом или одним циклом лечения. Этот полный цикл лечения (первые периоды и второй период) можно повторять несколько раз.

Авторы изобретения с удивлением обнаружили, что у яванских макак импульсное дозирование агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  RLI-15/SO-C101 в последовательные дни приводит к сильной, зависящей от дозы активации NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток (измеренной путем определения экспрессии Ki67, то есть, клетки становятся Ki67<sup>+</sup>) как в случае в/в, так и п/к, введения. В то же время  $T_{reg}$  не были индуцированы. Было удивительно, что после 1-го введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  приматам в день 1, 2-е введение такой же дозы в день 2 приводит к дополнительному увеличению активации как NK-клеток, так и CD8<sup>+</sup> T-клеток. 4-е введение в день 4 не приводило к дальнейшему увеличению активации, но все еще сохраняло высокие уровни активации. Впоследствии, период отдыха в несколько дней был достаточным для достижения аналогичных уровней активации при втором импульсе.

RLI-15 обеспечивает оптимальную активацию NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток при двух последовательных суточных дозах в неделю у приматов. Это удивительно, учитывая относительно короткий период полувыведения RLI-15, что результатом было большое количество пролиферирующих NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток даже через 4 дня после первого, и 3 дня после второго дозирования.

Долгосрочная непрерывная стимуляция среднеаффинного рецептора IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  не может обеспечить никакого дополнительного преимущества для стимулирования NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток в сравнении с относительно короткой стимуляцией двумя последовательными суточными дозами относительно короткоживущего агониста рецептора IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , такого как RLI-15. Напротив, непрерывная стимуляция за счет слишком частого дозирования или агонистов со значительно более длинным периодом полувыведения может даже вызывать истощение и анергию NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток у приматов.

Импульсное циклическое дозирование, и импульсное дозирование, предложенное в

настоящем документе, отличается от ранее описанных режимов дозирования для агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , протестированных на приматах и людях, в которых использовали непрерывное дозирование таких агонистов в попытке оптимизировать AUC и  $C_{max}$  с течением времени аналогично классическому лекарственному средству, то есть, в стремлении к постоянным уровням лекарственного средства и, следовательно, непрерывной стимуляции эффекторных клеток.

Например, дозы IL-2 и IL-15 вводят непрерывно: IL-2 в/в болюс в течение 15 мин каждые 8 часов; и IL-15 п/к в дни 1-8 и 22-29, или в/в непрерывной инфузией в течение 5 или 10 последовательных дней, или в/в ежедневно в течение 12 последовательных дней (смотри клинические испытания: NCT03388632, NCT01572493, NCT01021059). Дозы агониста IL-2/IL-15Rβγ hetIL-15 вводили приматам непрерывно в дни 1, 3, 5, 8, 10, 12 и 29, 31, 33, 36, 38 и 40 (то есть, всегда в дни 1, 3 и 5 недели). Отсутствие реакции пытались преодолеть путем увеличения дозы агониста IL-2/IL-15Rβγ вплоть до довольно высоких доз 64 мкг/кг (Вегдатаschi et al. 2018), намного выше переносимых доз для человека (Conlon et al. 2019). Человеку вводили hetIL-15 (NIZ985) в дозах 0,25-4,0 мкг/кг 2 неделиплюс/2 недели-минус п/к, опять-таки три раза в неделю (ТІW) (Conlon et al. 2019). Для сравнения, ALT-803 в клинических испытаниях на людях вводили один раз в неделю (в недели 1-5 четырех 6-недельных циклов) (Wrangle et al. 2018). И NKT-214 вводили один раз каждые 3 недели.

Результаты, полученные авторами изобретения, также противоречат сообщению Frutoso et al., согласно которому при импульсном дозировании у мышей (день 1 и день 3, с последующим перерывом во введении) вторая стимуляция агонистом IL-15 или IL-2/IL-15Rβγ не приводила к заметной активации NK-клеток in vivo (Frutoso et al. 2018).

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме дозирования, где х составляет 6, 7 или 8 дней, предпочтительно 7 дней. Из соображений удобства, предпочтительно, если пациенты получают лечение в недельном ритме, особенно, если такой ритм будет повторяться на протяжении многих недель, то есть, х составляет предпочтительно 7 дней, но можно обоснованно предположить, что изменение ритма на 6 или 8 дней не окажет существенного влияния на результат лечения, что делает 6 или 8 дней также предпочтительными вариантами осуществления.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где у составляет 2 или 3 дня, предпочтительно 2 дня. В экспериментах с яванскими макаками было показано, что оптимальная активация (измеряемая как Ki67<sup>+</sup>) как NK-клеток, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, может быть достигнута путем 2 ежедневных введений в неделю в 2 последовательных дня, при этом 4 ежедневных последовательных введения в течение одной недели не обеспечили никакого дополнительного преимущества в отношении активированных NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Иными словами, активация NK-клеток и CD8+ Т-клеток достигала плато между 2-м и 4-м введениями. Соответственно, 2 и 3, более

предпочтительно 2, последовательных ежедневных введения являются предпочтительными для минимизации воздействия на пациента лекарственным средством, но для достижения при этом высоких уровней активации эффекторных клеток.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где z составляет 6, 7 или 8 дней. С целью сохранения недельного ритма для удобства пациентов период z, в котором отсутствует введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , предпочтительно составляет 7 или 14 дней, более предпочтительно 7 дней.

изобретению Режиму дозирования ПО может предшествовать период предварительного лечения, когда агонист IL-2/IL-15R<sub>ву</sub> вводят в более низкой суточной дозе, вводимой реже, или когда более длительный перерыв в лечении используют для того, чтобы проверить реакцию пациента или добиться того, чтобы пациент привык к лечению, или подготовить иммунную систему к последующему более высокому иммунному клеточному ответу. Например, предусмотрен один дополнительный цикл лечения в качестве предварительного лечения с у днями лечения (например, 2 или 3 днями) в период лечения х (например, 7 дней), при этом z является более длительным периодом в сравнении со следующими циклами лечения (например, 14 дней вместо 7 дней).

В особо предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где х составляет 7 дней, у составляет 2 дня и z составляет 7 дней. Этот особо предпочтительный цикл лечения состоит из 2 введений в 2 последовательных дня, за которыми следуют 7-2=5 дней без введения, и таким образом, в недельном цикле объединено минимальное воздействие 2 введений агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , позволяющее достигать максимальной активации NK-клеток и CD8+ T-клеток, с недельным удобным для пациента циклом.

В особо предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где х составляет 7 дней, у составляет 2, 3 или 4 дня, и z составляет 7 дней. Хотя 2 введения в 2 последовательных дня, как показано, уже приводят к почти максимальной активации NKклеток и CD8+ клеток, 4 введения в 4 последовательных дня поддерживают такую активацию еще в течение двух дней, не приводя к заметному уменьшению количества активированных NK-клеток и CD8+ клеток. Таким образом, предпочтительным режимом лечения является режим, где х составляет 7 дней, у составляет 3 дня и z составляет 7 дней, то есть, 3 введения в 3 последовательных дня, за которыми следуют 7-3=4 дня без введения, что может оказаться полезным, если длительная активация NK-клеток и CD8+ Т-клеток приведет к более высокой эффективности. И другим альтернативным предпочтительным режимом лечения является режим, где х составляет 7 дней, у составляет 4 дня и z составляет 7 дней, то есть, 4 введения в 4 последовательных дня, за которыми следуют 7-4=3 дня без введения, что может оказаться полезным, если длительная активация NK-клеток и CD8+ Т-клеток приведет к более высокой эффективности.

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточная доза составляет от 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) до 50 мкг/кг (2,15 мкМ) агониста IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$ .

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточная доза составляет от 0,0043 мкМ до 2,15 мкМ агониста IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$ .

Авторы настоящего изобретения смогли продемонстрировать хорошую корреляцию между количеством RLI-15/SO-C101 (для которого 1 мкМ соответствует 23 мкг/кг) и пролиферацией NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток in vitro для человеческих NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также in vivo для яванских макак. На основании этой корреляции можно предсказать минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта (MABEL) при активные примерно 0,25 мкг/кг, фармакологические соответствующие от примерно 0,6 мкг/кг до 10 мкг/кг, наряду с уровнем отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений (NOAEL) при введении примерно 25 мкг/кг и максимальной переносимой дозой (MTD), соответствующей примерно 32 мкг/кг, для RLI-15 и агонистов IL-2/IL-15Rβγ, предпочтительно агониста IL-2/IL-15Rβγ с примерно такой же молекулярной массой. Эти значения соответствуют МАВЕL при введении примерно 0,011 мкМ агониста IL-2/IL-15Rβγ, PAD при введении от примерно 0,026 мкМ до 0,43 мкМ агониста IL-2/IL-15Rβγ, NOAEL при введении примерно 1,1 мкМ агониста IL-2/IL-15Rβγ и MTD при введении примерно 1,38 мкМ агониста IL-2/IL-15Rβγ.

С учетом возможных отклонений от прогноза была определена начальная доза 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) для клинического исследования, и наблюдаемая МТD у человека может достигать 50 мкг/кг (2,15 мкМ). Предпочтительно, доза составляет от 0,25 мкг/кг (0,011 мкМ) (MABEL) до 25 мкг/кг (1,1 мкМ) (NOAEL), более предпочтительно от 0,6 мкг/кг (0,026 мкМ) до 10 мкг/кг (0,43 мкМ) (PAD), более предпочтительно от 1 мкг/кг (0,043 мкМ) до 15 мкг/кг (0,645 мкМ) и, в частности, от 2 (0,087 мкМ) мкг/кг до 10 мкг/кг (0,43 мкМ).

Соответственно, в другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточная доза составляет от 0,0043 мкМ до 2,15 мкМ агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , предпочтительно доза составляет от 0,011 мкМ (MABEL) до 1,1 мкМ (NOAEL), и более предпочтительно от 0,026 мкМ до 0,43 мкМ (PAD).

В предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточную дозу, выбранную из диапазона доз 0,1-50 мкг/кг, предпочтительно 0,25-25 мкг/кг, более предпочтительно 0,6-10 мкг/кг и, в частности, 2-10 мкг/кг, практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, дозу поддерживают на протяжении режима введения. Удивительно, но режим введения по изобретению показал неоднократную активацию NК-клеток и CD8+ Т-клеток и отсутствие необходимости в увеличении дозы с течением

времени. Этого не наблюдалось, например, в режиме дозирования, используемом для hetIL-15, где использовали компенсацию путем прогрессивного удваивания доз от 2 до 64 мкг/кг (Bergamaschi et al. 2018). Таким образом, важным преимуществом является то, что выбранную суточную дозу в диапазоне 0,1-50 мкг/кг не обязательно увеличивать в рамках повторения первого периода введения, или от одного цикла к другому. Это позволяет повторять циклы лечения без риска попасть в токсичные дозы или риска того, что лечение со временем станет неэффективным. Кроме того, сохранение одной и той же суточной дозы во время режима лечения обеспечивает более высокий уровень соблюдения режима, поскольку врачам или медсестрам не нужно корректировать дозы от одной процедуры к другой.

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточная доза составляет от 3 мкг/кг (0,13 мкМ) до 20 мкг/кг (0,87 мкМ), предпочтительно от 6 мкг/кг (0,26 мкМ) до 12 мкг/кг (0,52 мкМ) агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточная доза представляет собой фиксированную дозу, независимую от массы тела, составляющую от 7 мкг до 3500 мкг (от 0,30 моль до 150 моль), предпочтительно от 17,5 мкг до 1750 мкг (от 0,76 моль до 76 моль), более предпочтительно от 42 мкг до 700 мкг (от 1,8 моль до 30 моль) и, в частности, от 140 мкг до 700 мкг (от 6,1 моль до 30 моль).

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где суточную дозу увеличивают на протяжении режима введения. Поскольку агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  приводит к размножению клеток, экспрессирующих рецептор IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и к повышенной экспрессии рецептора на поверхности, равные дозы агониста будут со временем приводить к сниженным концентрациям агониста в плазме, поскольку больше молекул агониста будут связаны с клетками. Для компенсации молекул, все более и более захватываемых клеткамимишенями, суточную дозу предпочтительно увеличивать на протяжении режима введения.

Такое увеличение суточной дозы предпочтительно может происходить после каждого периода из x дней. Как правило, такими увеличениями можно наилучшим образом оперативно управлять, если увеличения происходят после каждого импульса продолжительностью x дней. В частности, CD8 $^+$  T-клетки, судя по всему, теряют чувствительность к стимуляции агонистом IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  после импульсного лечения продолжительностью x дней. Соответственно, предпочтительно увеличивать суточную дозу после каждого импульса продолжительностью x дней (до достижения верхнего предела переносимой суточной дозы).

В одном варианте осуществления следующий цикл лечения вновь начинают с начальной суточной дозы, которую вновь увеличивают после каждого импульса продолжительностью х дней (смотри Фигуру 21, вариант А). Альтернативно, следующий

цикл лечения начинают с той же суточной дозы, что и последняя суточная (увеличенная) доза предыдущего импульса продолжительностью х дней) (смотри Фигуру 21, вариант В).

В одном варианте осуществления суточную дозу увеличивают на примерно 20% - примерно 100%, предпочтительно примерно 30% - примерно 50% после каждого периода из х дней для компенсации размножения клеток-мишеней.

Такое увеличение будет ограничено верхним пределом, который не может быть превышен, например, из-за ограничивающей дозу токсичности. Учитывая связывание агониста с клетками-мишенями, ожидается, однако, что этот верхний предел будет зависеть от количества клеток-мишеней, то есть, ожидается, что пациент с расширенным компартментом клеток-мишеней будет переносить более высокую дозу агониста в сравнении с (не получавшим лечение) пациентом с меньшим количеством клеток-мишеней. Тем не менее, верхний предел переносимой суточной дозы после увеличения дозы предположительно составляет 50 мкг/кг (2,15 мкМ), предпочтительно 32 мкг/кг (1,4 мкМ) и, в частности, 20 мкг/кг (0,87 мкМ).

В другом варианте осуществления суточную дозу увеличивают только один раз после первого периода из x дней, предпочтительно на примерно 20% - примерно 100%, предпочтительно на примерно 30% - примерно 50% после первого периода из x дней. Уже одно увеличение суточной дозы может приводить k достижению верхней границы переносимой суточной дозы, а k дальнейшем во время k дней без введения агониста k 2/IL-15k9k9 уровни k1k2 уровни k2k4 клетоk6k6k8k8k9 и очти нормальным уровням, что делает одно увеличение достаточным.

В другом варианте осуществления суточную дозу увеличивают после каждой суточной дозы на протяжении импульсного периода у. Предпочтительными вариантами осуществления являются такие, где в следующем периоде лечения х в одном и том же цикле следующая суточная доза может быть еще больше увеличена (смотри Фигуру 21, вариант С) или может быть сохранен тот же уровень суточной дозы, что и у последней суточной дозы предыдущего периода лечения х (смотри Фигуру 21, вариант D). Между циклами лечения суточная доза может вновь начинаться с начального уровня дозы (смотри Фигуру 21, варианты С и В) или продолжаться на уровне дозы, увеличенном относительно первого дня лечения предыдущего периода лечения х (смотри Фигуру 21, вариант Е). Опять-таки, такое увеличение будет ограничено верхним пределом, который не может быть превышен, например, из-за ограничивающей дозу токсичности. Учитывая связывание агониста с клетками-мишенями, ожидается, однако, что этот верхний предел будет зависеть от количества клеток-мишеней, то есть, ожидается, что пациент с расширенным компартментом клеток-мишеней будет переносить более высокую дозу агониста в сравнении с (не получавшим лечение) пациентом с меньшим количеством клеток-мишеней. Тем не менее, верхний предел переносимой суточной дозы после увеличения дозы предположительно составляет 50 мкг/кг (2,15 мкМ), предпочтительно 32 мкг/кг (1,4 мкM) и, в частности, 20 мкг/кг (0,87 мкM).

В одном варианте осуществления агонист ІL-2/IL-15 КВу предназначен для

использования в циклическом режиме введения, где суточную дозу вводят одной инъекцией. Однократные ежедневные инъекции удобны для пациентов и поставщиков медицинских услуг, и, следовательно, являются предпочтительными.

Однако, учитывая короткий период полувыведения молекулы и гипотезу о том, что активация иммунных клеток зависит от увеличения концентрации агонистов IL-2/IL-15 Rβγ, а не от постоянных уровней такого агониста, в другом предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 2 или 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 4 ч, и предпочтительно не более 12 ч (плотное импульсное циклическое дозирование). Ожидается, что одно и то же количество агониста - разделенное на несколько доз и введенное в течение дня - будет более эффективно CD8<sup>+</sup> человеческие NK-клетки, особенно клетки, стимулировать демонстрируют более низкую чувствительность к стимуляции, чем при однократной инъекции. Это удивительным образом наблюдалось у мышей. Практически, такое многократное дозирование должно вписываться в ежедневную деятельность больниц, врачебную практику или амбулаторные условия и, таким образом, введение 2-3 равных доз в рабочее время, включая смены от 8 до 12 часов, будет вполне осуществимо, причем интервалы в 8 или 10 часов являются предпочтительными в качестве максимального временного интервала между первой и последней дозой. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 5 ч до примерно 7 ч, предпочтительно примерно 6 часов. Это означает, что пациент может получать дозу, например, в 7 часов утра, 2 часа дня и 7 часов вечера каждый день (с 6-часовыми интервалами), или в 7 часов утра, 1 час дня и 6 часов вечера (с 5-часовыми интервалами). В другом предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 2 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 6 ч до примерно 10 ч, предпочтительно 8 ч. В случае 2 доз пациент может получать дозу, например, в 8 часов утра и в 4 часа дня (с 8-часовым интервалом). Учитывая ежедневную рутину в больницах, интервалы между введениями могут варьироваться в течение дня или в разные дни.

В другом предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где агонист IL-2/IL-15Rβγ вводят подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б), предпочтительно п/к. Авторы изобретения наблюдали в исследовании на яванских макаках, что п/к введение было более эффективным, чем в/в введение, с точки зрения активации NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток. В/б введение имеет сходные фармакодинамические эффекты с п/к введением. Таким образом, в/б введение является другим предпочтительным вариантом осуществления, особенно при раке, развивающемся в органах брюшной полости, например, раке яичника, поджелудочной железы, колоректальном раке, раке желудка и печени, а также при

метастазах, возникающих вследствие локорегионарного распространения и отдаленного метастазирования внебрюшинного рака.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где введение агониста IL-2/IL-15Rβγ на этапе (а) приводит к увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15Rβγ, и где введение агониста IL-2/IL-15Rβγ на этапе (b) приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (а). Ki-67 является маркером пролиферирующих клеток и, таким образом, процентное содержание Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток является показателем для определения состояния активации соответствующей популяции NK-клеток. Было неожиданно показано, что повторение ежедневных последовательных введений после х-у дней без введения агониста вновь приводит к сильной активации NK-клеток, уровень которой составлял по меньшей мере 70% от уровня активации NK-клеток во время первого периода с ежедневными введениями в течение х дней (этап а). Уровень активации NK-клеток измеряют как % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где введение агониста IL-2/IL-15Rβγ приводит к поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15Rβγ, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода. Альтернативно или дополнительно, для измерения активации NK-клеток также важно общее количество NK-клеток, и было показано, что повторение ежедневных последовательных введений после х-у дней без введения агониста приводит в среднем к увеличению общего количества NK-клеток за одно или два повторения первого периода (а). В абсолютных цифрах введение агониста IL-2/IL-15Rβγ приводило к количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере примерно 1,1×10<sup>3</sup> NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где его циклическое введение повторяют в течение по меньшей мере 3 циклов, предпочтительно 5 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 10 циклов, и даже более предпочтительно до прогрессирования заболевания. Учитывая наблюдение авторов изобретения, что после начальной сильной активации NK-клеток и CD8+ Т-клеток в фазе 1 исследования фармакокинетики и фармакодинамики на яванских макаках при 4 последовательных ежедневных введениях, с последующим перерывом во введении, составляющем 18 дней, NK-клетки и CD8+ Т-клетки вновь могут быть сильно активированы, можно сделать обоснованный вывод, что 2 или 3 повторения ежедневных введений в последовательные дни можно вновь повторять

после перерыва во введении. Соответственно, предусмотрено повторение по меньшей мере 3 циклов, предпочтительно 5 циклов или предпочтительно по меньшей мере 10 циклов для стимуляции иммунной системы, например, в случае инфекционных заболеваний. Поскольку у опухолей часто развивается резистентность к большинству вариантов лечения, для лечения опухолей особенно предусмотрено повторение циклов до прогрессирования заболевания.

Агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где рак представляет собой гематологический рак или солидный рак. Поскольку принцип действия этих агонистов заключается в активации врожденного иммунного ответа посредством активации NK-клеток и активации адаптивного иммунного ответа посредством активации CD8+ Т-клеток, принято считать, что эти агонисты обладают большим потенциалом для лечения как (прогрессирующих) солидных опухолей, так и новообразований, злокачественных что уже многочисленных мышиных моделях рака и в ряде клинических испытаний при различных разновидностях опухолей (Robinson and Schluns 2017). Соответственно, агонисты IL-2/IL-15 Кру были протестированы при колоректальном раке, меланоме, почечноклеточном раке, аденокарциноме, карциноидной опухоли, лейомиосаркоме, раке молочной железы, глазной меланоме, остеосаркоме, раке щитовидной железы, холангиокарциноме, раке слюнных желез, аденоидно-кистозной карциноме, раке желудка, плоскоклеточной карциноме головы и шеи, раке яичников, уротелиальном раке (Conlon et al. 2019). ALT-803 был протестирован при AML и MDS в качестве примеров гематологических злокачественных новообразований (Romee et al. 2018). В частности, пациенты с прогрессирующими опухолевыми заболеваниями, такими как метастатические опухоли, могут предпочтительно извлечь выгоду из такого лечения. В этом отношении ALT-803 прошел соответствующие испытания при метастатическом немелкоклеточном раке легкого (Wrangle et al. 2018). Планируемое клиническое исследование фазы 1/1b с SO-С101 (смотри пример 9) будет открыто для пациентов с почечно-клеточной карциномой, немелкоклеточным раком легких, мелкоклеточным раком легких, раком мочевого пузыря, меланомой, карциномой из клеток Меркеля, плоскоклеточной карциномой кожи, опухолями с высокой микросателлитной нестабильностью, солидными негативным раком молочной железы, мезотелиомой, раком щитовидной железы, раком тимуса, раком шейки матки, раком желчных путей, гепатоцеллюлярной карциномой, раком яичников, раком желудка, плоскоклеточной карциномой головы и шеи и раком анального канала. Примерами гематологических форм рака являются лейкозы, такие как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML) и острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфомы, такие как лимфомы Ходжкина, неходжкинские лимфомы и миеломы.

Соответственно, почечно-клеточная карцинома, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, меланома, карцинома из клеток

Меркеля, плоскоклеточная карцинома кожи, солидные опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью, трижды негативный рак молочной железы, мезотелиома, рак щитовидной железы, рак тимуса, рак шейки матки, рак желчных путей, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников, рак желудка, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак анального канала, а также ALL, AML, CLL, CML, AMoL, лимфомы Ходжкина, неходжкинские лимфомы и миеломы являются предпочтительными для данного лечения формами рака.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где агонист IL-2/IL-15Rβγ имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч. Предпочтительно, период полувыведения in vivo представляет собой период полувыведения in vivo, составляющий, при определении у мышей, от 30 мин до 12 ч, более предпочтительно от 1 ч до 6 ч. В другом предпочтительном варианте осуществления период полувыведения in vivo представляет собой период полувыведения in vivo, составляющий, при определении у яванских макак или макак, от 1 ч до 24 ч, более предпочтительно от 2 ч до 12 ч. В другом варианте осуществления период полувыведения in vivo, определяемый у яванских макак, составляет от 30 мин до 12 часов, более предпочтительно от 30 мин до 6 часов.

Фармакокинетические и фармакодинамические свойства агонистов IL-2/IL-15Rβγ по изобретению зависят от периода полувыведения in vivo таких агонистов. Благодаря различным генно-инженерным технологиям период полувыведения in vivo был увеличен, например, путем создания более крупных белков за счет слияния с Fc-фрагментом RO687428) или антителом антитела (например, ALT-803, (RG7813, RG7461, иммуноцитокины, описанные в WO 2012/175222A1, WO 2015/018528A1, 2015/109124), или за счет пегилирования (NKT-214). Однако слишком длинный период полувыведения может фактически стимулировать NK-клетки слишком долго, что приводит к преимущественному накоплению зрелых NK-клеток с измененной активацией и сниженной функциональной способностью (Elpek et al. 2010, Felices et al. 2018). Таким образом, предпочтительный агонист IL-2/IL-15Rβγ имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч, или предпочтительно от 30 мин до 12 часов, более предпочтительно от 30 мин до 6 часов. Предпочтительно, этот период полувыведения in vivo соответствует периоду полувыведения у человека. Однако, поскольку определение периода полувыведения in vivo у людей, если это не опубликовано, может быть неэтичным, также предпочтительно использовать период полувыведения in vivo у мышей или приматов, таких как яванские макаки или макаки. Учитывая в целом более короткий период полувыведения у мышей, период полувыведения in vivo, определяемый у мышей, предпочтительно составляет от 30 мин до 12 ч, более предпочтительно от 1 ч до 6 ч или от 30 мин до 6 ч, и период полувыведения in vivo, определяемый у яванских макак или макак, составляет от 1 ч до 24 ч, более предпочтительно от 2 ч до 12 ч или от 30 мин до 6 ч.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где агонист IL-2/IL-15Rβγ является по меньшей мере на 70% мономерным, предпочтительно по меньшей мере на 80% мономерным. Агрегаты таких агонистов также могут влиять на фармакокинетические и фармакодинамические свойства агонистов и, таким образом, их следует избегать в интересах воспроизводимости результатов.

В другом предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где агонист IL-2/IL-15R<sub>β</sub>γ представляет собой комплекс интерлейкина-15 (IL-15)/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15Rα). Комплексы IL-15/IL-15Rα представляют собой комплексы (ковалентные или нековалентные), включающие IL-15 или его производное и по меньшей мере sushi домен IL-15Ra или его производное. Они направлены на среднеаффинный IL- $2/IL-15R\beta\gamma$ , то есть, рецептор, состоящий из  $IL-2/IL-15R\beta$  и  $\gamma_c$  субъединиц, который экспрессируется на NK-клетках, CD8<sup>+</sup> Т-клетках, NKT-клетках и уб Т-клетках. Эти комплексы хорошо известны в данной области, и их способности к связыванию хорошо изучены, тогда как другие попытки за счет модификации IL-2 уменьшения/отмены связывания IL-2R, или синтетические подходы могут столкнуться с непредсказуемыми рисками. Предпочтительно, комплекс содержит человеческий ІL-15 или его производное и sushi домен IL-15Ra (SEQ ID NO: 6), sushi+ домен IL-15Ra (SEQ ID NO: 7) или растворимую форму IL-15Rα (от аминокислоты 31 до любой из аминокислот 172, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 или 205 в SEQ ID NO: 5, смотри WO 2014/066527, (Giron-Michel et al. 2005)).

В более предпочтительном варианте осуществления комплекс IL-15/IL-15Rα представляет собой слитый белок, содержащий sushi домен IL-15Rα человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15Rα человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, более предпочтительно содержащий sushi+ фрагмент (SEQ ID NO: 7), и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4. Такой слитый белок предпочтительно имеет следующий порядок расположения компонентов (от N- к C-концу) IL-15Rα-линкер-IL-15 (RLI-15). Особенно предпочтительным агонистом IL-2/IL-15Rβγ является слитый белок, обозначенный RLI2 (SO-C101), имеющий последовательность SEQ ID NO: 9.

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где в сочетании с агонистом IL-2/IL-15Rβγ вводят дополнительное лекарственное средство. В последние годы методы лечения рака, как правило, сочетают с существующими или новыми лекарственными средствами для борьбы с опухолями за счет нескольких механизмов действия. В то же время сложно или неэтично заменять устоявшиеся методы лечения новыми, поэтому, как правило, новые методы лечения сочетают со стандартом лечения для обеспечения дополнительной пользы для пациента. Соответственно, и в случае предложенных режимов дозирования их также необходимо сочетать с режимами введения других лекарственных препаратов.

Дополнительное лекарственное средство и агонист IL-2/IL-15Rβγ можно вводить в одни и те же дни и/или в разные дни. Введение в один и тот же день, как правило, более удобно для пациентов, так как сводит к минимуму посещения больницы или врача. С другой стороны, режим введения в разные дни может стать важным для определенных сочетаний, если может возникнуть нежелательное взаимодействие между агонистом по изобретению и другим лекарственным средством.

Фраза «введенные в сочетании», как правило, не означает, что два средства совместно формулируют и совместно вводят, но скорее одно средство имеет этикетку, которая предписывает его использование в сочетании с другим. Так, например, агонист  $IL-2/IL-15R\beta\gamma$  предназначен для использования в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, где использование включает одновременное, раздельное или последовательное введение агониста  $IL-2/IL-15R\beta\gamma$  и дополнительного лекарственного средства, или наоборот. Однако ничто в настоящей заявке не должно исключать того, что два комбинированных средства предоставляют в виде пакета или набора, или даже совместно формулируют и совместно вводят, если их режимы дозирования совпадают.

Поскольку типичным путем клинического развития является сочетание со стандартом лечения, введение сочетаемого средства продолжается и, таким образом, не зависит от режима введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

В другом варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где дополнительное лекарственное средство представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек (или, для краткости, ингибитор контрольных точек) или терапевтическое антитело.

Предпочтительно, ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело вводят в начале каждого периода (а) каждого цикла. Для гарантии точного соблюдения своевременного дозирования терапевтических средств и минимизации количества процедур, циклы введения агониста и ингибитора контрольных точек, или терапевтического антитела, в идеале начинают вместе, например в одну и ту же неделю. В зависимости от потенциальных взаимодействий между агонистом и сочетаемым антителом, это может быть в один и тот же день или в разные дни одной недели. Например, размножение сначала NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток в течение 1, 2, 3 или 4 дней до добавления ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела может приводить к повышению эффективности лечения.

В одном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в циклическом режиме введения, где x дней и z дней адаптируют к тому, чтобы целочисленное кратное значение x дней+z дней (n×x+z при n={2, 3, 4, 5, ...}) равнялось количеству дней одного цикла лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом, или, если цикл лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом меняется с течением времени, равнялось количеству дней каждого отдельного цикла лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом.

Например, ингибиторы контрольных точек или терапевтическое антитело, как правило, вводят каждые 3 или каждые 4 недели. Например, режим лечения агонистами ІС-2/IL-15Rβγ по настоящему изобретению соответствует режиму лечения ингибитором контрольных точек, если как агонист IL-2/IL-15Rβγ, так и ингибитор контрольных точек, вводят в начале первого периода (а) (период лечения х), предпочтительно в первый день первого периода (а), и ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело в дальнейшем не вводят до конца цикла лечения. Затем в каждом следующем цикле лечения ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело вновь вводят в начале, предпочтительно в первый день, периода (а). Соответственно, если х составляет 7 дней (то есть, неделю), (а) повторяют один раз (так что целочисленное кратное значение п равно 2), и z составляет 7, ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело будут введены каждые 3 недели ( $2 \times 7 + 7 = 3$  недели), или, если х равно 7, (a) повторяют два раза (так что целочисленное кратное значение n равно 3), и z составляет 7, ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело будут введены каждые 4 недели (3×7+7=4 недели). В случае 6-недельного режима введения ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела введение агониста может быть запланировано на 3 недельных цикла  $(2 \times 7 + 7)$  или один 6-недельный цикл  $(5 \times 7 + 7)$  или  $(4 \times 7)$  на Случае, если режим введения ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела меняется с течением времени, как правило, ритм режимов введения адаптируют путем удлинения периода z для синхронизации ритмов, например, увеличивая z=7 до z=14.

В предпочтительном варианте осуществления ингибитор контрольных точек может представлять собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-LAG3, анти-TIM-3, анти-CTLA4 антитело или анти-TIGIT антитело, предпочтительно анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело. Эти антитела имеют общее то, что они блокируют/препятствуют клеточным взаимодействиям, которые блокируют или лишают возможности иммунные клетки, в частности, Т-клетки, соответственно, уничтожать раковые клетки, все данные антитела являются антагонистическими антителами. Примерами анти-PD-1 антител являются пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб (REGN2810), BMS-936558, SHR1210, IBI308, PDR001, BGB-A317, BCD-100 и JS001; примерами анти-PD-L1 антител являются авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, KN035 и MGD013 (биспецифическое для PD-1 и LAG-3); примером анти-PD-L2 антител является sHIgM12; примерами анти-LAG-3 антител являются релатлимаб (BMS 986016), Sym022, REGN3767, TSR-033, GSK2831781, MGD013 (биспецифическое для PD-1 и LAG-3) и LAG525 (IMP701); примерами анти-ТІМ-3 антител являются TSR-022 и Sym023; примерами анти-CTLA-4 антител являются ипилимумаб и тремелимумаб (тицилимумаб); примерами анти-TIGIT антител являются тираголумаб (MTIG7192A, RG6058) и этигилимаб.

Особенно предпочтительным является сочетание агониста IL-2/IL-15Rβγ, в частности, SO-C101, с пембролизумабом для использования в циклическом режиме введения. В настоящее время пембролизумаб вводят каждые 3 недели. Соответственно, в

предпочтительном варианте осуществления агонист также вводят в 3-недельном цикле, то есть, х составляет 7 дней и повторяют два раза, с у, составляющим 2, 3 или 4 дня, и z составляющим 7 дней. В одном варианте осуществления пембролизумаб вводят либо в первый день каждого цикла лечения, как и агонист, либо в любой другой день в течение такого цикла лечения, предпочтительно в день 3, день 4 или день 5 такого цикла лечения, для обеспечения размножения/активации NK-клеток и CD8+ T-клеток до добавления ингибитора контрольных точек. Іп vitro эксперименты по настоящему изобретению показали, что как одновременное, так и последовательное, введение приводит к заметному увеличению продуцирования IFN $\gamma$  в МКПК. Недавно предписание для препарата пембролизумаба было расширено, и теперь его можно применять каждые 6 недель. В сравнении с режимами, описанными в данном разделе выше, режим введения агониста предпочтительно будет адаптирован либо для двух 3-недельных циклов (например, x=7, повторение 4 раза с z=7, или x=7, повторение 3 раза с z=14).

В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое антитело или направленное на опухоль антитело может быть выбрано из анти-CD38 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD79B антитела, анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR2 антитела, анти-GD2 антитела, антитела против нектина 4 и анти-Trop-2 антитела, предпочтительно представляет собой анти-CD38 антитело. Такое терапевтическое антитело или направленное на опухоль антитело может быть связано с токсином, то есть, представлять собой конъюгат антитело-лекарственное средство. Терапевтические антитела оказывают прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки-мишени за счет связывания с мишенью, экспрессируемой на поверхности опухолевой клетки. Терапевтическая активность может быть следствием связывания рецептора, приводящего к измененной сигнализации в клетке, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или другого опосредованного антителом уничтожения опухолевых клеток. Например, авторы изобретения показали, что агонист IL-2/IL-15Rβγ RLI-15/SO-C101 действует синергически с анти-CD38 антителом (даратумумаб), уничтожая опухолевые клетки Daudi in vitro как при последовательном, так и при одновременном использовании, что было подтверждено на модели множественной миеломы in vivo. Соответственно, анти-CD38 антитела являются особенно предпочтительными. Примерами анти-CD38 антител являются даратумумаб, изатуксимаб (SAR650984), MOR-202 (MOR03087), TAK-573 или TAK-079 или GEN1029 (HexaBody®-DR5/DR5), наиболее при этом предпочтительным является даратумумаб. Предпочтительно, даратумумаб вводят в соответствии с его инструкцией по применению, особенно предпочтительно, путем в/в инфузии, и/или в дозе, рекомендованной в его инструкции по применению, предпочтительно в дозе 16 мг/кг.

В предпочтительном варианте осуществления агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для использования в циклическом режиме введения, где анти-CD38 антитело,

предпочтительно даратумумаб, вводят в сочетании с агонистом IL-2/IL-15Rβy, при этом (i) анти-CD38 антитело вводят один раз в неделю в течение первого периода 8 недель, (ii) затем следует второй период, состоящий из 4 секций по 4 недели (16 недель), при этом в течение каждой 4-недельной секции анти-СD38 антитело вводят еженедельно в первые 2 недели секции, с последующими 2 неделями без введения, (ііі) затем следует третий период с введением анти-CD38 антитела один раз каждые 4 недели до прогрессирования заболевания. Таким образом, предпочтительно вводить анти-CD38 антитело один раз в неделю в течение первых 8 недель, за которыми следуют 16 недель с 2 введениями один раз в неделю и 2 недели перерыва во введении, а вслед за тем один раз в каждые 4 недели до прогрессирования заболевания. В соответствии с режимом введения агониста IL-2/IL-15R, начинающимся со дня первого введения агониста, в недели с введением анти-CD38 антитела анти-CD38 антитело вводят в 1-й день (одновременное введение) или в 3-й день (последовательное введение) недели. Режим введения с x=7, повторением один раз и z=14 совпадает с первым периодом 8-недельного введения анти-СD38 (смотри Фигуру 13 А или В), затем следует второй период с x=7, повторением один раз и z=14 (смотри Фигуру 14 A или B), после чего следует третий период с x=7, повторением один раз и z=14 (смотри Фигуру 15 А или В). Альтернативно, режим введения агониста может быть следующим: x=7, повторение два раза и z=7, для соответствия 4-недельному ритму введения анти-CD38 антитела.

Примером анти-CD19 антитела является блинатумомаб (биспецифическое для CD19 и CD3), анти-CD20 антитела являются офатумумаб и обинутузумаб, анти-CD30 антитела является брентуксимаб, анти-CD33 антитела является гемтузумаб, анти-CD52 антитела является алемтузумаб, анти-CD79B антитела является полатузумаб, анти-EGFR антитела является цетуксимаб, анти-HER2 антитела является трастузумаб, анти-VEGFR2 антитела является рамуцирумаб, анти-GD2 антитела является динутуксимаб, антитела против нектина 4 является энфортумаб и анти-Trop-2 антитела является сацитузумаб.

Примерами совмещенных режимов дозирования является сочетание SO-C101 с рамуцирумабом, который вводят каждые 2-3 недели в зависимости от заболевания. В случае 3-недельного цикла введения рамуцирумаба SO-C101 можно вводить в режиме: x=7, повторение один раз и z=7. В случае двух 2-недельных циклов введения рамуцирумаба SO-C101 можно вводить в режиме: x=7, повторение два раза и z=7.

## Импульсное дозирование

Другой вариант осуществления относится к агонисту IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в соответствии со следующим режимом введения, включающим

- (i) введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку в суточной дозе в течение первого количества последовательных дней; и
  - (ii) второе количество дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ, где первое количество составляет 2, 3 или 4 дня, и второе количество составляет 3,

4 или 5 дней, при этом первое количество и второе количество в сумме составляют 7 дней.

Данная схема введения может быть описана как «импульсное циклическое» дозирование - «импульсное», поскольку агонист IL-2/IL-15Rβγ вводят, например, в день 1 и день 2 недели для активации и размножения как NK, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток («импульс»), затем не вводят агонист до конца недели. Такой импульсный режим введения доз повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере два раза, более предпочтительно ПО меньшей мере 4 раза, наиболее предпочтительно прогрессирования заболевания. Предпочтительно, первое количество дней и второе количество дней в сумме составляют 7 дней (2+5, 3+4 или 4+3 дней), таким образом, первое количество дней и второе количество дней составляют цикл импульсного циклического режима.

Варианты осуществления, описанные выше для импульсного циклического дозирования, применимы к импульсному дозированию, если они не относятся к циклическому дозированию. Это, в частности, применимо к вариантам осуществления, относящимся к вводимой дозе агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , пути введения (например, п/к или в/б), влиянию на активацию NK-клеток и количеству NK-клеток, состояниям, подлежащим лечению, периоду полувыведения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , агонисту IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  и совместному введению ингибиторов контрольных точек.

Предпочтительно, агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для использования в импульсном режиме дозирования, где суточная доза составляет от 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) до 50 мкг/кг (2,15 мкМ), предпочтительно от 0,25 мкг/кг (0,011 мкМ) до 25 мкг/кг (1,1 мкМ), более предпочтительно от 0,6 мкг/кг (0,026 мкМ) до 10 мкг/кг (0,43 мкМ) и, в частности, от 2 мкг/кг (0,087 мкМ) до 10 мкг/кг (0,43 мкМ), предпочтительно, где суточную дозу, выбранную из диапазона доз от 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) до 50 мкг/кг (2,15 мкМ), практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, дозу поддерживают на протяжении режима введения. Также предпочтительно, если суточная доза составляет от 3 мкг/кг (0,13 мкМ) до 20 мкг/кг (0,87 мкМ), предпочтительно от 6 мкг/кг (0,26 мкМ) до 12 мкг/кг (0,52 мкМ).

В другом варианте осуществления в импульсном дозировании используют суточную дозу, представляющую собой фиксированную дозу, независимую от массы тела, составляющую от 7 мкг до 3500 мкг, предпочтительно от 17,5 мкг до 1750 мкг, более предпочтительно от 42 мкг до 700 мкг и, в частности, от 140 мкг до 700 мкг.

В другом варианте осуществления в импульсном дозировании используют суточную дозу, которую увеличивают на протяжении режима введения. Предпочтительно, суточную дозу увеличивают после каждого периода из х дней. В следующем варианте осуществления суточную дозу увеличивают на 20% - 100%, предпочтительно на 30% - 50% после каждого периода из х дней.

В другом варианте осуществления суточную дозу увеличивают один раз после первого цикла. Предпочтительно, суточную дозу увеличивают на 20% - 100%, предпочтительно на 30% - 50% после первого цикла.

В одном варианте осуществления импульсного дозирования суточную дозу вводят одной инъекцией.

В альтернативном варианте осуществления импульсного дозирования суточную дозу разделяют на 2 или 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 4 ч, и предпочтительно не более 14 ч. Предпочтительно, суточную дозу разделяют на 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 5 ч до примерно 7 ч, предпочтительно примерно 6 часов. Или, также предпочтительно, суточную дозу разделяют на 2 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 6 ч до примерно 10 ч, предпочтительно примерно 8 ч.

В другом варианте осуществления импульсного дозирования агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б), предпочтительно п/к.

Предпочтительно, как более подробно описано выше, введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (а) приводит к (1) увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и при этом введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (b) приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (а), или (2) приводит к поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода, и/или (3) приводит к количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере 1,1×10<sup>3</sup> NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.

В случае импульсного дозирования также предпочтительно, если циклическое введение повторяют на протяжении по меньшей мере 5 циклов, предпочтительно 8 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 15 циклов, и даже более предпочтительно до прогрессирования заболевания.

В другом варианте осуществления импульсного режима дозирования агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч. В другом варианте осуществления период полувыведения in vivo составляет от 30 мин до 12 часов, более предпочтительно от 30 мин до 6 часов, предпочтительно, при определении у яванских макак.

В другом варианте осуществления импульсного режима дозирования агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  представляет собой комплекс интерлейкина-15 (IL-15)/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ), предпочтительно слитый белок, содержащий sushi домен IL-15R $\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное,

предпочтительно, где sushi домен IL-15Rα человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4, более предпочтительно, где комплекс IL-15/IL-15Rα имеет последовательность SEQ ID NO: 9.

Кроме того, агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для использования в импульсном дозировании может быть введен в сочетании с дополнительным лекарственным средством. Предпочтительно, дополнительное лекарственное средство и агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят в одни и те же дни и/или в разные дни. Также предпочтительно, если введение дополнительного лекарственного средства выполняют в соответствии с режимом введения, который не зависит от режима введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

В одном варианте осуществления импульсного режима дозирования дополнительное лекарственное средство выбрано из ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела.

Предпочтительно, ингибитор контрольных точек выбран из анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-TIM-3 антитела, анти-CTLA4 антитела или анти-TIGIT антитела, предпочтительно представляет собой анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело.

И предпочтительно, терапевтическое антитело выбрано из анти-CD38 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD79B антитела, анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR2 антитела, анти-GD2 антитела, антитела против нектина 4 и анти-Trop-2 антитела, предпочтительно представляет собой анти-CD38 антитело.

Предпочтительно, агонист IL-2/IL-15Rβγ предназначен для применения, где анти-CD38 антитело вводят один раз в неделю в течение первых 8 недель, за которыми следуют 16 недель с 2 введениями один раз в неделю и 2 недели перерыва во введении, а вслед за тем один раз каждые 4 недели до прогрессирования заболевания. Например, первое количество дней составляет 2 дня, второе количество дней составляет 5 дней, и анти-CD38 антитело вводят один раз в неделю в каждый 3-й день недели или в каждый 1-й день недели; и при этом введение продолжают в течение 8 недель. Или первое количество дней составляет 2 дня, второе количество дней составляет 5 дней, и анти-CD38 антитело вводят в течение 16 недель один раз в неделю в 3-й день каждой 1-й недели и 2-й недели каждого 4-недельного цикла, или в 1-й день каждой 1-й недели и 2-й недели один раз в неделю в 3-й день каждой 1-й недели каждого 4-недельного цикла, а затем анти-CD38 антитело вводят до прогрессирования заболевания один раз в неделю в 3-й день каждой 1-й недели каждого 4-недельного цикла, или в 1-й день каждой 1-й недели каждого 4-недельного цикла, или в 1-й день каждой 1-й недели каждого 4-недельного цикла, или в 1-й день каждой 1-й недели каждого 4-недельного цикла.

Анти-CD38 антитело предпочтительно представляет собой даратумумаб, MOR202, изатуксимаб, GEN1029, TAK-573 или TAK-079, более предпочтительно анти-CD38 антитело представляет собой даратумумаб. Предпочтительно, даратумумаб вводят путем в/в инфузии в дозе, рекомендованной в его инструкции по применению, предпочтительно в дозе 16 мг/кг.

#### Плотное импульсное дозирование

В другом аспекте изобретения агонист рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) предназначен для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациентучеловеку с использованием плотного импульсного режима введения, где плотный («плотный импульсный») режим введения включает:

- (а) первый период из х дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15Rβ $\gamma$  вводят в суточной дозе в течение у последовательных дней в начале первого периода, затем в течение х-у дней агонист IL-2/IL-15Rβ $\gamma$  не вводят, где х составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день, предпочтительно, 7 или 14 дней, и у составляет 2, 3 или 4 дня, предпочтительно 2 или 3 дня;
  - (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и

где суточную дозу разделяют на 2 или 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 4 ч, и предпочтительно не более 12 ч.

Предпочтительно, режим введения дополнительно включает (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  («плотное импульсное циклическое» введение), где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 или 70 дней, предпочтительно 7, 14, 21 или 56 дней, более предпочтительно 7 дней или 21 день.

Ожидается, что одно и то же количество агониста - разделенное на несколько доз и введенное в течение дня - будет более эффективно стимулировать человеческие NK-клетки, особенно  $CD8^+$  клетки, последние демонстрируют более низкую чувствительность к стимуляции, чем при однократной инъекции.

Такое многократное дозирование должно вписываться в ежедневную деятельность больниц, врачебную практику или амбулаторные условия и, таким образом, введение 2-3 равных доз в рабочее время, включая смены от 8 до 12 часов, будет вполне осуществимо, причем интервалы в 8 или 10 часов являются предпочтительными в качестве максимального временного интервала между первой и последней дозой.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 5 ч до примерно 7 ч, предпочтительно примерно 6 часов. Это означает, что пациент может получать дозу, например, в 7 часов утра, 2 часа дня и 7 часов вечера каждый день (с 6-часовыми интервалами), или в 7 часов утра, 1 час дня и 6 часов вечера (с 5-часовыми интервалами). В другом предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 2 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 6 ч до примерно 10 ч, предпочтительно 8 ч. В случае 2 доз пациент может получать дозу, например, в 8 часов утра и в 4 часа дня (с 8-часовым интервалом). Учитывая ежедневную рутину в больницах, интервалы между введениями могут варьироваться в течение дня или

в разные дни. Удивительно, но у мышей такое же количество (примерно 40 мкг/кг) SO-C101, разделенное на 3 дозы (13 мкг/кг), вводимые в течение дня, привели к резкому увеличению количества  $CD8^+$  Т-клеток, а также  $Ki67^+$  CD8 Т-клеток, в качестве показателя пролиферирующих  $CD8^+$  Т-клеток, и даже количество, разделенное на 3x 7 мкг/кг дозы все еще приводило к гораздо более сильному размножению и активации  $CD8^+$  Т-клеток (смотри Фигуру 19).

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 5 ч до примерно 7 ч, предпочтительно примерно 6 часов. Это означает, что пациент может получать дозу, например, в 7 часов утра, 2 часа дня и 7 часов вечера каждый день (с 6-часовыми интервалами), или в 7 часов утра, 1 час дня и 6 часов вечера (с 5-часовыми интервалами). В другом предпочтительном варианте осуществления суточную дозу разделяют на 2 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 6 ч до примерно 10 ч, предпочтительно 8 ч. В случае 2 доз пациент может получать дозу, например, в 8 часов утра и в 4 часа дня (с 8-часовым интервалом). Учитывая ежедневную рутину в больницах, интервалы между введениями могут варьироваться в течение дня или в разные дни.

Варианты осуществления, описанные выше в настоящем документе для импульсного циклического дозирования, применимы и для плотного импульсного дозирования (и плотного импульсного циклического дозирования, как подвида плотного импульсного дозирования). Это особенно применимо к вариантам осуществления, относящимся к вводимой дозе агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , пути введения (например, п/к или в/б), влиянию на активацию NK-клеток и количеству NK-клеток, состояниям, подлежащим лечению, периоду полувыведения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , агонисту IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  и совместному введению ингибиторов контрольных точек.

Предпочтительно, агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  предназначен для применения в режиме плотного импульсного или плотного импульсного циклического дозирования, где суточная доза составляет от 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) до 50 мкг/кг (2,15 мкМ), предпочтительно от 0,25 мкг/кг (0,011 мкМ) до 25 мкг/кг (1,1 мкМ), более предпочтительно от 0,6 мкг/кг (0,026 мкМ) до 10 мкг/кг (0,43 мкМ) и, в частности, от 2 мкг/кг (0,087 мкМ) до 10 мкг/кг (0,43 мкМ), предпочтительно, где суточную дозу, выбранную из диапазона доз от 0,1 мкг/кг (0,0043 мкМ) до 50 мкг/кг (2,15 мкМ), практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, дозу поддерживают на протяжении режима введения. Также предпочтительно, если суточная доза составляет от 3 мкг/кг (0,13 мкМ) до 20 мкг/кг (0,87 мкМ), предпочтительно от 6 мкг/кг (0,26 мкМ) до 12 мкг/кг (0,52 мкМ).

В другом варианте осуществления для плотного импульсного дозирования используют суточную дозу, представляющую собой фиксированную дозу, независимую

от массы тела, составляющую от 7 мкг до 3500 мкг, предпочтительно от 17,5 мкг до 1750 мкг, более предпочтительно от 42 мкг до 700 мкг и, в частности, от 140 мкг до 700 мкг.

В другом варианте осуществления для плотного импульсного дозирования используют суточную дозу, которую увеличивают на протяжении режима введения. Предпочтительно, суточную дозу увеличивают после каждого периода из х дней. В следующем варианте осуществления суточную дозу увеличивают на 20% - 100%, предпочтительно на 30% - 50% после каждого периода из х дней.

В другом варианте осуществления суточную дозу увеличивают один раз после первого цикла. Предпочтительно, суточную дозу увеличивают на 20% - 100%, предпочтительно на 30% - 50% после первого цикла.

В другом варианте осуществления плотного импульсного дозирования агонист IL- $2/IL-15R\beta\gamma$  вводят подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б), предпочтительно п/к.

Предпочтительно, как более подробно описано выше, введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (а) приводит к (1) увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и при этом введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (b) приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (а), или (2) приводит к поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода, и/или (3) приводит к количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере 1,1×10<sup>3</sup> NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.

В случае плотного импульсного циклического дозирования также предпочтительно, если циклическое введение повторяют на протяжении по меньшей мере 5 циклов, предпочтительно 8 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 15 циклов и даже более предпочтительно до прогрессирования заболевания.

В другом варианте осуществления плотного импульсного режима дозирования агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч.

В другом варианте осуществления плотного импульсного режима дозирования агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  представляет собой комплекс интерлейкина-15 (IL-15)/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ), предпочтительно слитый белок, содержащий sushi домен IL-15R $\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15R $\alpha$  человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4, более предпочтительно, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  имеет последовательность SEQ ID NO: 9.

Кроме того, агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для использования в плотном импульсном

дозировании может быть введен в сочетании с дополнительным лекарственным средством. Предпочтительно, дополнительное лекарственное средство и агонист IL-2/IL- $15R\beta\gamma$  вводят в одни и те же дни и/или в разные дни. Также предпочтительно, если введение дополнительного лекарственного средства выполняют в соответствии с режимом введения, который не зависит от режима введения агониста IL-2/IL- $15R\beta\gamma$ .

В одном варианте осуществления плотного импульсного режима дозирования дополнительное лекарственное средство выбрано из ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела.

Предпочтительно, ингибитор контрольных точек выбран из анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-TIM-3 антитела, анти-CTLA4 антитела или анти-TIGIT антитела, предпочтительно представляет собой анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело.

И предпочтительно, терапевтическое антитело выбрано из анти-CD38 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD79B антитела, анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR2 антитела, анти-GD2 антитела, антитела против нектина 4 и анти-Trop-2 антитела, предпочтительно представляет собой анти-CD38 антитело.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору, включающему несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в циклических режимах введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору, включающему несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в импульсных режимах введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору, включающему несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в плотных импульсных режимах введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Другой вариант осуществления относится к применению агониста IL-2/IL-15Rβγ в производстве набора для лечения рака или инфекционного заболевания, где набор включает:

несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в циклическом режиме введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Другой вариант осуществления относится к применению агониста IL-2/IL-15Rβγ в

производстве набора для лечения рака или инфекционного заболевания, где набор включает:

несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в импульсном режиме введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Другой вариант осуществления относится к применению агониста IL-2/IL-15Rβγ в производстве набора для лечения рака или инфекционного заболевания, где набор включает:

несколько доз агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по изобретению, инструкцию по введению такого агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в плотном импульсном режиме введения по любому из вариантов осуществления, описанных выше, и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

В предпочтительном варианте осуществления набор дополнительно включает ингибитор контрольных точек и инструкцию по применению ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела.

Изобретение также относится к способам лечения рака и инфекционных заболеваний, включающим вышеописанные импульсные циклические, импульсные и плотные импульсные режимы дозирования, а также к способам стимулирования NK-клеток и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток, включающим вышеописанные импульсные циклические, импульсные и плотные импульсные режимы дозирования.

#### Плотное дозирование

В другом аспекте изобретения агонист рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) предназначен для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациентучеловеку с использованием плотного режима введения, где плотный режим введения включает введение пациенту суточной дозы, при этом суточную дозу разделяют на 2 или 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 4 ч, и предпочтительно не более 12 ч.

Временной интервал между введением отдельных доз может быть таким, как описано выше для вариантов осуществления. Количество агониста IL-2/IL-15Rβγ также может быть таким, как описано выше для вариантов осуществления.

### Фигуры

Фигура 1: Фармакодинамическое исследование на яванских макаках: в фазе 1 RLI-15/SO-C101 вводили в/в путем 60-минутной инфузии или п/к путем инъекции яванским макакам (группы приведены в Таблице 2, 2 животных на группу) один раз в день в дни 1-4 в указанных дозах (для подробностей смотри режим дозирования (A), левая часть). Количество пролиферирующих Кі67<sup>+</sup> NK-клеток (B) и пролиферирующих Кі67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток (C) определяли в день 5 методом иммунофлуоресцентного анализа.

В фазе 2 после двухнедельного периода вымывания яванским макакам вводили 6/6 путем 60-минутной инфузии или  $n/\kappa$  в день исследования Д22 (1 введение), в дни Д22, Д23 (2 введения) или Д22-Д25 (4 введения) в группах, представленных на (A) и в Таблице 3.

- (**D**) Проточно-цитометрические анализы проводили через 5 дней после первого введения в Д26. Фракцию Ki67-положительных клеток определяли в клеточных фракциях  $CD3^*CD8^*CD45^*$  (NK-клетки) и  $CD3^*CD8^*CD45^*$  (CD8 $^*$  T-клетки). Данные собирали от группы I (I введение), групп 4, 5, 7 (объединенные, 2 введения) и группы 6 (4 введения).
- (E) Увеличение общего количества лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток у яванских макак после п/к введения при 2 введениях (группа 5) во время фазы 1 (4 ежедневных введения в Д1, Д2, Д3 и Д4, 10 мкг/кг RLI п/к) и фазы 2 (2 последовательных ежедневных введения в течение трех последовательных недель, Д22, Д23, Д29, Д30, Д36 и Д37, показано стрелками, 15 мкг/кг п/к) с двухнедельным периодом отдыха между фазой 1 и фазой 2. Анализ лимфоцитов проводили в день 5 каждой недели дозирования. Количество лимфоцитов определяли в процессе гематологического анализа, количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток определяли методом проточной цитометрии, и умножали их относительное содержание в составе CD45<sup>+</sup> клеток на общее количество белых клеток крови.
- (**J**)-(**Q**) Сравнение результатов двух введений (L, M, P, Q) и четырех введений (J, K, N, O), в каждом случае в неделю 1 и неделю 3 фазы 2 (группы 3 и 4), для NK-клеток (J, K, L, M) и  $CD8^+$  Т-клеток (N, O, P, Q).

Фигура 2: RLI-15/SO-C101 вводили  $n/\kappa$  в дозе 100 мкг/кг в 4 последовательных дня в неделю (Д1-Д4, Д8-Д11, Д15-Д18 и Д22-Д25) путем инъекции яванским макакам (2 животных). Показано размножение клеток, измеренное методом проточной цитометрии, в виде количества клеток ( $10^3/$ мкл) для NK-клеток (треугольники), CD8<sup>+</sup> Т-клеток (кружки, пунктирная линия) и общего количества лимфоцитов (кружки, сплошная линия) с течением времени (дни).

Фигура 3: Соотношение доз для опосредованной RLI-15/SO-C101 активации NK и  ${\rm CD8}^+$  T-клеток у человека/in vitro и яванских макак/in vivo (включая фармакодинамику и фармакокинетику), и  ${\rm C}_{\rm max}$ , наблюдаемая in vivo. In vivo дозы показаны в соответствии с достигнутым значением  ${\rm C}_{\rm max}$ . Полученные методом проточной цитометрии данные по пролиферации NK и  ${\rm CD8}^+$  Т-клеток (окрашенные CFSE пролиферирующие клетки), индуцированной путем in vitro стимуляции RLI-15 человеческих МКПК (7 дней) и in vivo введения RLI-15 яванским макакам (4 последовательных дня п/к, FACS в день 5), коррелировали. Аналогично, концентрации, используемые in vitro и полученные в  $\Phi$ К

исследованиях на яванских макаках, показаны по оси X. Эквивалентные дозы для человека были рассчитаны путем аллометрического масштабирования с использованием 3,1 в качестве поправочного коэффициента. MABEL: минимальный ожидаемый уровень эффекта, PAD: диапазон фармакологически активных доз, NOAEL: уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений, MTD: максимальная переносимая доза.

Фигура 4: Зависимое от концентрации RLI-15-индуцированное размножение NК-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и регуляторных Т-клеток. Фармакодинамику RLI-15/SO-C101 in vivo на мышах тестировали с использованием RLI-15 в разных концентрациях (10, 20, 35 и 50 мкг/дозу), вводимого п/к или в/б один раз в день в течение 4 последовательных дней (2 животных на группу). Относительное размножение (A) NK-клеток (CD3<sup>-</sup>, CD49b/DX5<sup>+</sup>), (B) CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Т-клеток) и (C) регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток) определяли методом проточной цитометрии в спленоцитах в день 5; (контроль - не подвергнутые воздействию мыши). Массу влажных легких определяли как показатель синдрома утечки сосудов (СУС), оцениваемого в день 5 (**D**).

Фигура 5: Оценка RLI-15-индуцированного антиметастатического эффекта в мышиной модели опухоли RENCA после в/в введения. (А) Схема эксперимента. RLI-15/SO-C101 вводили в соответствии с приведенными режимами один раз в день в/в после того, как опухолевые клетки Renca были введены в/в инъекцией в день 0. Селезенки для FACS анализа иммунных клеток собирали в день 5, и в день 12 для определения фармакодинамики. Массу тела и выживаемость животных отслеживали до дня 16. В день 16 мышей умеривляли, и легкие извлекали для анализа метастатической нагрузки. (В) Массу легких (в качестве суррогатного показателя метастатической нагрузки) в г оценивали в день 16 для конкретных групп лечения. (С) Оценка массы тела мышей на протяжении курса лечения RLI-15 в модели опухоли RENCA в выбранные дни. Данные были нормализованы на 100% средней массы тела в каждой группе в день 0. Сплошная черная линия с самой низкой конечной точкой: опухоль; пунктирная черная линия со второй самой низкой конечной точкой: Д1+Д8; серая линия - с третьей самой низкой конечной точкой: Д1+Д8; серая линия - с третьей самой низкой конечной точкой: Д1+Д8; серая линия - с третьей самой низкой конечной точкой: Д1-Д2+Д8-Д9.

B день 5 и день 12 после начала введения RLI-15 спленоциты анализировали на относительное размножение NK-клеток и Ki-67<sup>†</sup> NK-клеток (делящихся NK-клеток) ( $\mathbf{D}$ ), а также  $CD8^{\dagger}$  Т-клеток из  $CD3^{\dagger}$  клеток и Ki-67<sup>†</sup>  $CD8^{\dagger}$  Т-клеток из CD8+ клеток (делящихся  $CD8^{\dagger}$  Т-клеток) ( $\mathbf{E}$ ); Koнтроли=не подвергнутые воздействию - без опухолей, без лечения; опухоль=мыши с опухолями, без лечения; другие группы: мыши с опухолями, получавшие один раз в день дозы RLI-15 в указанные дни.

Фигура 6: Оценка RLI-15-индуцированного антиметастатического эффекта в мышиной модели опухоли RENCA после  $n/\kappa$  введения в сравнении с  $IL15_{N72D}$ :  $IL15Ra_{sushi}$ -Fc. 10 мкг или 20 мкг RLI-15/SO-C101 или 5 мкг  $IL15_{N72D}$ :  $IL15Ra_{sushi}$ -Fc вводили в соответствии с приведенными режимами один раз в день  $n/\kappa$  после того, как опухолевые

клетки Renca были введены в/в инъекцией в день 0. Массу тела и выживаемость животных отслеживали до дня 16. В день 16 мышей умерщвляли, и легкие извлекали для дальнейшего анализа. (А) Массу легких (в качестве суррогатного показателя метастатической нагрузки) в г оценивали в день 16 для конкретных групп лечения. (В) Оценка массы тела мышей на протяжении курса лечения в модели опухоли RENCA в выбранные дни. Данные были нормализованы на 100% средней массы тела в каждой группе в день 0. Черная линия с самой низкой конечной точкой: опухоль; красная линия со второй самой низкой конечной точкой: RLI-15 20 мкг в Д1-Д3; синяя линия со второй по высоте конечной точкой: RLI-15 10 мкг в Д1-Д4; зеленая линия со второй самой низкой конечной точкой и вторыми самыми низкими промежуточными точками: RLI-15 20 мкг в Д1-Д4; оранжевая линия с самой высокой конечной точкой: IL15<sub>N72D</sub>:IL15Ra<sub>sushi</sub>-Fc 5 мкг в Д1.

Фигура 7: Режим дозирования в первом клиническом испытании на человеке. \*  $\pm 1$  день; ОДТ - ограничивающая дозу токсичность;

- (A) Часть А: режим дозирования SO-C101
- (**B**) Часть В: режим дозирования SO-C101 в сочетании с пембролизумабом.

Фигура 7: Уничтожение опухолевых клеток in vitro в результате <u>одновременного</u> применения сочетания RLI-15 и даратумумаба. Человеческие МКПК от 5 здоровых доноров совместно культивировали с опухолевыми клетками Daudi в отсутствие (-) или в присутствии (+) RLI-15/SO-C101 (RLI 1 нМ) и/или даратумумаба в возрастающих концентрациях (0, 0,1 нМ, 1 нМ или 10 нМ DAR) в течение 20 ч при  $37^{\circ}$ С. Показано процентное содержание мертвых опухолевых клеток Daudi, измеренное методом проточной цитометрии с окрашиванием DAPI<sup>+</sup>. Результаты считали статистически значимыми при p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*).

Фигура 9: Уничтожение опухолевых клеток in vitro в результате последовательного применения сочетания RLI-15 и даратумумаба. Человеческие  $MK\Pi K$  от 6 здоровых доноров инкубировали с добавлением, или без добавления, RLI-15/SO-C101 (1 нМ) в течение 48 ч in vitro при 37°C либо в инактивированной нагреванием (ИН), либо в активной сыворотке. Затем стимулированные ч $MK\Pi K$  совместно культивировали с опухолевыми клетками Daudi в отсутствие (-) или в присутствии (+) даратумумаба в возрастающих концентрациях (0, 0,1 нМ, 1 нМ или 10 нМ DAR) в течение 4 ч при 37°C. Показано процентное содержание мертвых опухолевых клеток Daudi, измеренное методом проточной цитометрии с окраишванием  $DAPI^+$ . Результаты считали статистически значимыми при p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*).

Фигура 10: Противоопухолевая эффективность in vivo в результате одновременного введения сочетания RLI-15 и даратумумаба. Мышам CB17 SCID инокулировали  $n/\kappa$   $1\times10^7$  клетки миеломы RPMI 8226. Начинали введение солевого раствора (10 мкл/г  $n/\kappa$  в дни 0, 1, 2 и 3), RLI-15/SO-C101 (1 мг/кг  $n/\kappa$  в дни 0, 1, 2 и 3), даратумумаба (20 мг/кг в/б в день 4) или RLI-15/SO-C101 и даратумумаба в концентрациях и в дни, которые указаны выше.

- (А) Объем опухолей (мм³) в зависимости от времени (дни), начиная с дня 0, когда начинали п/к введение солевого раствора или RLI-15 (день 0=день рандомизации в группы, когда объем опухолей составлял ~100 мм³). Контрольная группа введения солевого раствора (черные кружки на сплошной линии), группа введения RLI-15/SO-C101 (черные кружки на пунктирной линии), группа введения даратумумаба (серые кружки на пунктирной линии) группа введения сочетания RLI-15+даратумумаб (серые кружки на сплошной линии).
- (В) Количество мышей с отторгнутыми опухолями (%) в зависимости от времени (дни), начиная с дня 0, когда начинали п/к введение солевого раствора или RLI-15. Контрольная группа введения солевого раствора (черная сплошная линия не видна на оси х), группа введения RLI-15 (черная пунктирная линия), группа введения даратумумаба (серая пунктирная линия не видна на оси х) и группа введения сочетания RLI-15+даратумумаб (серая сплошная линия).

Фигура 11: Противоопухолевая эффективность in vivo в результате последовательного введения сочетания RLI-15 и даратумумаба. Мышам CB17 SCID инокулировали  $n/\kappa$   $1\times10^7$  клетки миеломы RPMI 8226. Начинали введение солевого раствора (10 мкл/г  $n/\kappa$  в дни 0, 1, 2 и 3), RLI-15/SO-C101 (1 мг/кг  $n/\kappa$  в дни 7, 8, 9 и 10), даратумумаба (20 мг/кг в/б в день 0) или RLI-15/SO-C101 и даратумумаба в концентрациях и в дни, которые указаны выше.

- (А) Объем опухолей (мм³) в зависимости от времени (дни), начиная с дня 0, когда начинали п/к введение солевого раствора или в/б введение даратумумаба (день 0=день рандомизации в группы, когда объем опухолей составлял ~100 мм³). Контрольная группа введения солевого раствора (черные кружки на сплошной линии), группа введения RLI-15 (черные кружки на пунктирной линии), группа введения даратумумаба (серые незаштрихованные кружки на пунктирной линии) и группа введения сочетания RLI-15+даратумумаб (серые кружки на сплошной линии).
- (В) Количество мышей с отторгнутыми опухолями (%) в зависимости от времени (дни), начиная с дня 0, когда начинали п/к введение солевого раствора или даратумумаба. Контрольная группа введения солевого раствора (черная сплошная линия не видна на оси х), группа введения RLI-15 (черная пунктирная линия не видна на оси х), группа введения даратумумаба (серая пунктирная линия) и группа введения сочетания RLI-15+даратумумаб (серая сплошная линия).

Фигура 12: Режим дозирования в клиническом исследовании для RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом; RLI-15 - n/к в дозе, определенной в ходе первого клинического испытания на человеке (сплошная стрелка указывает день введения); даратумумаб - 16 мг/кг в/в инфузия один раз в неделю в течение 8 недель (всего 8 доз, пунктирная стрелка указывает день введения):

- (A) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д3, Д10 и Д17, 3-недельного цикла.
  - (B) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и

даратумумабом, вводимым в Д1, Д8 и Д15, 3-недельного цикла.

Фигура 13: Режим дозирования в клиническом исследовании для RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом; RLI-15 - n/к в дозе, определенной в ходе первого клинического испытания на человеке (сплошная стрелка указывает день введения); даратумумаб - 16 мг/кг в/в инфузия один раз в неделю в течение 8 недель (всего 8 доз, пунктирная стрелка указывает день введения):

- (A) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д3, Д10, Д17 и Д24, 4-недельного цикла.
- (**B**) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в  $\Pi$ 1+ $\Pi$ 2 и  $\Pi$ 8+ $\Pi$ 9, и даратумумабом, вводимым в  $\Pi$ 1,  $\Pi$ 8,  $\Pi$ 15 и  $\Pi$ 22, 4-недельного цикла.

Фигура 14: Режим дозирования в клиническом исследовании для RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом в недели 9-24; RLI-15 - n/к в дозе, определенной в ходе первого клинического испытания на человеке (сплошная стрелка указывает день введения); даратумумаб - 16 мг/кг в/в инфузия два раза в 4 недели (всего 8 доз, начиная с недели 9 всего курса лечения, пунктирная стрелка указывает день введения):

- (**A**) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д3 и Д10, 4-недельного цикла.
- (**B**) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д1 и Д8, 4-недельного цикла.

Фигура 15: Режим дозирования в клиническом исследовании для RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом, начиная с недели 25 и далее до прогрессирования заболевания; RLI-15 - n/к в дозе, определенной в ходе первого клинического испытания на человеке (сплошная стрелка указывает день введения); даратумумаб - 16 мг/кг в/в инфузия один раз в 4 недели (начиная с недели 25 всего курса лечения, пунктирная стрелка указывает день введения):

- (**A**) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д3, 4-недельного цикла.
- (**B**) режим введения сочетания, с RLI-15, вводимым в Д1+Д2 и Д8+Д9, и даратумумабом, вводимым в Д1, 4-недельного цикла.

Фигура 16: Исследование фармакодинамики RLI-15/SO-C101 на яванских макаках: режимы дозирования для групп G1-G8 с введением в недели исследования H1-H10. Каждая точка соответствует одному введению суточной дозы 40-80 мкг/кг RLI-15/SO-C101, как указано.

Фигура 17: а) и b) Показана зависимость от времени (дни) количества NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (клеток/мкл) в группах лечения 1, 8, 3, 2 и 6 для самцов (заштрихованные кружки) и самок (заштрихованные квадраты); дни дозирования подчеркнуты. c) и d) Показана зависимость от времени (дни) процентного содержания Ki67<sup>+</sup> NK-клеток и Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток в группах лечения 1, 8, 3, 2 и 6 для самцов (заштрихованные кружки) и самок (заштрихованные квадраты); дни дозирования подчеркнуты.

Фигура 18: Исследование фармакодинамики RLI-15/SO-C101 на яванских макаках

для исследования непрерывного воздействия за счет 3 введений в день: режимы дозирования для групп: группы 1, группы 2 и группы 3 при введении в дни исследования Д1-Д14. Каждая точка соответствует одному введению дозы 7-40 мкг/кг RLI-15/SO-C101, как указано.

Фигура 19: Показана зависимость от времени (дни) количества NK-клеток и  $CD8^+$ Т-клеток ( $10^9$  клеток/мл (левые панели),  $Ki67^+$  NK-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток (средние панели), экспрессии CD8 CD8<sup>+</sup> Т-клетками в виде средней интенсивности флуоресценции (правая верхняя панель) и процентного содержания CD122<sup>+</sup> клеток в CD8+ клетках (правая нижняя панель) для группы 1 (кружки,  $1 \times 40$  мкг/кг), группы 2 (треугольники,  $3 \times 7$ группы (квадраты, *3×13* мкг/кг), заштрихованные мкг/кг) где кружки/треугольники/квадраты соответствуют самиам, незаштрихованные кружки/треугольники/квадраты соответствуют самкам.

Фигура 20: Исследование фармакодинамики RLI-15/SO-C101 на яванских макаках: режимы дозирования для групп G1-G6 с введением в недели исследования H1-H10 для G3-G6/H12 для G1 и G2. Каждая точка соответствует суточной дозе, разделенной на 2 или 3 введения (заштрихованные кружки: 2 введения с 8-ч интервалами; незаштрихованные кружки: 3 введения с 6-ч интервалами) в суточной дозе 13-30 мкг/кг, как указано. Для G1-G6 суточная доза не была увеличена в течение всего периода исследования. Для G6 начальная суточная доза составляла 20 мкг/кг с введением в дни 1 и 2 недель 1 и 2, и суточную дозу увеличивали до 30 мкг/кг в дни 1 и 2 недель 4, 5 и 7, 8 (увеличенные заштрихованные кружки).

Фигура 21: Графическое представление импульсных циклических режимов введения. А-Е показаны различные сценарии увеличения суточной дозы: А - после первого периода лечения х каждого цикла лечения, при этом каждый цикл лечения вновь начинается с начальной дозы; В - после каждого периода лечения х каждого цикла лечения, при этом суточную дозу не увеличивают после перерыва z; С - после каждого дня лечения в каждом периоде лечения х, при этом каждый цикл лечения вновь начинается с начальной дозы; D - после каждого дня лечения в каждом периоде лечения х, при этом суточную дозу не увеличивают от одного периода лечения х до следующего в пределах цикла, и при этом каждый цикл лечения вновь начинается с начальной дозы; Е - после каждого дня лечения в каждом периоде лечения х, при этом суточную дозу не увеличивают от одного периода лечения х до следующего в пределах цикла, и при этом суточная доза первого периода лечения х нового цикла соответствует суточной дозе в день 1 предыдущего периода лечения х.

#### Последовательности

SEQ ID NO: 1 - человеческий IL-2

- 1 MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML
- 61 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
- 121 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT

153

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 61 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 121 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153 SEQ ID NO: 3 - человеческий IL-15 1 MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISDLKKI 061 EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS 162 SEQ ID NO: 4 - зрелый человеческий IL-15 NW VNVISDLKKI 061 EDLIOSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELOVISL ESGDASIHDT VENLIILANN 121 SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS 162 SEQ ID NO: 5 - человеческий IL-15Ra 1 MAPRRARGCR TLGLPALLLL LLLRPPATRG ITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN 61 SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIRDPALV HQRPAPPSTV TTAGVTPQPE 121 SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAAIVPGS QLMPSKSPST GTTEISSHES SHGTPSQTTA 181 KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTTVAIST STVLLCGLSA VSLLACYLKS RQTPPLASVE 241 MEAMEALPVT WGTSSRDEDL ENCSHHL SEQ ID NO: 6 - sushi домен IL-15Rα CPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKC SEQ ID NO: 7 - sushi+ фрагмент IL-15Rα ITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIRDPALV HQRPAPP SEQ ID NO: 8 - линкер SGG SGGGSGGGSGG GGGGSGG SEO ID NO: 9 - RLI2 ITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS 061 LKCIRDPALV HQRPAPPSGG SGGGGSGGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA 121 TLYTESDVHP SCKVTAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV ENLIILANNS LSSNGNVTES 181 GCKECEELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINT S 211 SEQ ID NO: 10 - IL2v 1 APASSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 41 TAKFAMPKKA TELKHLOCLE EELKPLEEVL NGAOSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 101 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFAQSIIS TLT SEQ ID NO: 11 - Пептид лидера (IL- $15_{N72D}$ )<sub>2</sub>:IL- $15R\alpha_{sushi}$ -Fc: METDTLLLWV LLLWVPGSTG SEQ ID NO: 12 - IL-15Rα<sub>sushi</sub> (65aκ)-Fc (IgG1 CH2-CH3): 1 ITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS 61 LKCIREPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED 120 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA 180 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN 240 YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

### SEQ ID NO: 13 - IL-15<sub>N72D</sub>

NW VNVISDLKKI

061 EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILAN<u>D</u> 121 SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

### ПРИМЕРЫ

### 1. Проточная цитометрия

### Антитела для экспериментов с мышами

Для панели  $T_{eff}$ 

Антиген	Флуорофор	Клон	Производитель	Разведение
CD3	PE-Cy7®	145-2C11	eBioscience <sup>TM</sup>	1:40
CD4	PerCP	RM4-5	BD Pharmingen	1:100
CD8	V500	53-6.7	BD Horizon	1:80
CD44	APC	IM7	eBioscience <sup>TM</sup>	1:500
CD122	ef450	TM-b1	eBioscience <sup>TM</sup>	1:100
NKG2D	PE	CX5	eBioscience <sup>TM</sup>	1:40
PD-1	FITC	J43	eBioscience <sup>TM</sup>	1:40
Live/dead	Viab.Dye 780		eBioscience <sup>TM</sup>	
Ki67	A700	SolA15	eBioscience <sup>TM</sup>	0,35 мкл/лунку

### Для панели T<sub>reg</sub>/NK-клетки

Антиген	Флуорофор	Клон	Производитель	Разведение
CD45	FITC	30-F11	eBioscience™	1:100
CD3	PE-Cy7®	145-2C11	eBioscience <sup>TM</sup>	1:40
CD8	V500	53-6.7	BD Horizon	1:80
CD4	PerCP	RM4-5	BD Pharmingen	1:100
CD49b	ef450	DX5	eBioscience <sup>TM</sup>	1:20
CD25	APC	PC61.5	eBioscience <sup>TM</sup>	1:300
Live/dead	Viab.Dye 780		eBioscience <sup>TM</sup>	
Ki67	A700	SolA15	eBioscience <sup>TM</sup>	0,35 мкл/лунку
FoxP3	PE	FJK-15s	eBioscience <sup>TM</sup> 1 мкл/лун	

### Антитела для экспериментов с яванскими макаками

Для панели  $T_{eff}$ 

Антиген	Флуорофор	Клон	Производитель	мкл/лунку
CD45	PE-Cy7 <sup>®</sup>	D058-1283	BD biosciences	2
CD3	APC-Cy7®	SP34-2	BD biosciences	2
CD4	V450	L200	BD biosciences	2
CD8	HV605	SK1	BD biosciences	2

CD28	APC	CD28.2	BD biosciences	2
CD95	FITC	DX2	BD biosciences	2
CD122	PE	Mik-β2	BD biosciences	2
Fix. Viab	eFluor® 506		eBioscience <sup>TM</sup>	0,5
Ki-67	A700	B56	BD biosciences	2

Для панели T<sub>reg</sub>/NK-клетки

Антиген	Флуорофор	Клон	Производитель	мкл/лунку
CD45	PE-Cy7®	D058-1283	BD biosciences	2
CD3	APC-Cy7®	SP34-2	BD biosciences	2
CD4	V450	L200	BD biosciences	2
CD8	HV605	SK1	BD biosciences	2
CD20	PE	2H7	BD biosciences	2
CD25	APC	CD25-4E3	BD biosciences	2
Fix. Viab	eFluor® 506		eBioscience <sup>TM</sup>	0,5
FoxP3	A488	206D	Biolegend <sup>®</sup>	2
Ki-67	A700	B56	BD biosciences	2

### Обработка крови обезьян для получения МКПК

10 мкл крови использовали для прямого определения жизнеспособности методом проточной цитометрии с окрашиванием DAPI (2 мкл DAPI/лунку+190 мкл PBS+ЭДТА). 300 мкл свежей крови инкубировали с 6 мл буфера для лизиса эритроцитов (BioLegend®, 10х буфер, разведенный в дН<sub>2</sub>О до 1х) в течение 15 минут (для получения МКПК), с защитой от света, центрифугировали и 2х промывали 10 мл FACS-буфера (PBS, Lonza® + 2% эмбриональной бычьей сыворотки (U.S.), инактивированной нагреванием, Sigma Aldrich®). Центрифугирование проводили при 300 g в течение 5 мин при 4°С. Осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл FACS-буфера, и 10 мкл суспензии клеток использовали для определения жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии с окрашиванием DAPI после лизиса эритроцитов (+90 мкл FACS-буфера, +1,2 мкл DAPI). Суспензию клеток высевали в 96V-луночный планшет с 2 лунками на один образец, клетки центрифугировали в 96V-луночном планшете (2200 об/мин, 2 мин, 4°С) и окрашивали методом проточной цитометрии.

### Проточная цитометрия (FACS), окрашивание для исследований на яванских макаках

Внеклеточные антигены (CD антигены) окрашивали с использованием вышеуказанных панелей для проточной цитометрии -  $\frac{1}{2}$  панели для  $T_{eff}$ ,  $\frac{1}{2}$  панели для  $T_{reg}/NK$  - смесью соответствующих внеклеточных антител и фиксируемым красителем на жизнеспособность в FACS-буфере (готового 50 мкл/образец) в течение 30 мин при 4°C, защищая от воздействия света. Образцы дважды промывали FACS-буфером и

центрифугировали при 2200 об/мин и 4°C в течение 2 мин. Клетки фиксировали, добавляя 100 мкл/лунку фиксирующего буфера (1 часть концентрата для фиксации: 3 части разбавителя для фиксации) в течение 20 мин при 4°C. После процедуры фиксации клетки пермеабилизировали в буфере для пермеабилизации - 1:9 в д $H_2O$  в течение 5 мин при RT и центрифугировали при 2200 об/мин и 4°C в течение 2 мин.

Внутриклеточные антигены (Кі67 и FoxP3) окрашивали с использованием вышеприведенных панелей для проточной цитометрии -  $\frac{1}{2}$  панели для  $T_{eff}$ ,  $\frac{1}{2}$  панели для  $T_{reg}/NK$  - смесью соответствующих внутриклеточных антител плюс 3 мкл крысиной сыворотки/лунку в буфере для пермеабилизации (готового 50 мкл/образец) в течение 30 мин при 4°C, защищая от воздействия света. Образцы дважды промывали FACS-буфером и центрифугировали при 2200 об/мин и 4°C в течение 2 мин. Клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания. 120 мкл суспензии клеток использовали для измерений в 96V-луночном планшете сразу после окрашивания.

### Получение мышиных спленоцитов

Селезенки собирали от мышей, переносили в пробирки gentleMACS C, содержащие 5 мл FACS-буфера (PBS, 2 ммоль ЭДТА+2% ЭБС), и хранили на льду до следующей обработки. Каждую селезенку обрабатывали в отдельной пробирке. Пробирки плотно закрывали и устанавливали в перевернутом состоянии в муфту устройства для диссоциации gentleMACS. Программы GentleMACS: м\_селезенка - использовали в течение 60 сек. Проводили полную диссоциацию селезенок, получая суспензию спленоцитов. Суспензию клеток пропускали через 70-мкм фильтр (белый) в 50-мл пробирки Falcon. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин при 4°С. Осадки ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса АСК (Gibco) путем пипетирования клеток вверх и вниз с использованием 1-мл наконечника, и добавляли еще 2 мл буфера для лизиса АСК. Эритроциты лизировали в течение 10 минут для получения спленоцитов. Через 10 минут добавляли 27 мл FACS-буфера. Спленоциты вновь центрифугировали при 1200 об/мин, 10 мин, 4°С, и осадок клеток ресуспендировали в 1 мл FACS-буфера. Суспензию клеток пропускали через 30-мкм фильтр (зеленый) в 14-мл пробирки Falcon.

### Проточная цитометрия (FACS), окрашивание для исследований на мышах

Суспензию спленоцитов разносили по 100 мкл/лунку в 96V-луночные планшеты для окрашивания в двойном повторе. Планшеты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 мин при 4°С. Клетки блокировали блокатором Fc-рецепторов (анти-CD16/CD32 мышей - Fc-блокатор, eBioscience<sup>TM</sup>, 1 мкл/лунку) и 10% мышиной сывороткой (2 мкл/лунку) в 17 мкл FACS-буфера в течение 30 мин при 4°С. Лунки промывали 2х FACS-буфером путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 мин при 4°С.

Для внеклеточного окрашивания клетки окрашивали смесью соответствующих внеклеточных антител (для эффекторных Т-клеток против антигенов: CD3, CD4, CD8, CD44, CD122 CD62L; для  $T_{reg}$ /NK-клеток против антигенов: CD3, CD4, CD8, CD49b, CD25) и фиксировали Fixable Viability Dye eFluor<sup>TM</sup> 780 (разведение 1:200, eBioscience<sup>TM</sup>) в FACS-буфере (готового 10 мкл/образец) в течение 30 мин при 4°C (защищая от

воздействия света). Клетки промывали 2x FACS-буфером (200 мкл, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 мин при 4°C).

Для фиксации клетки, описанные выше, фиксировали добавлением по 100 мкл/лунку буфера для фиксации (1:3 - концентрат:разбавитель; концентрат для фиксации/пермеабилизации, еВіоsсіепсе<sup>тм</sup>; разбавитель для фиксации/пермеабилизации еВіоsсіепсе<sup>тм</sup>) в течение 30 мин при 4°С. После процедуры фиксации клетки пермеабилизировали в буфере для пермеабилизации (1:9 в д $H_2O$ , 5 мин при RT) и центрифугировали (2200 об/мин, 2 мин, 4°С).

Для внутриклеточного окрашивания клетки, описанные выше, промывали 2x по  $100\,$  мкл/лунку буфера для промывания/пермеабилизации (eBioscience<sup>TM</sup> - 1:9 - буфер:  $\mathrm{дH_2O}$ ) и центрифугировали при  $2000\,$  об/мин в течение  $3\,$  мин при  $4^\circ\mathrm{C}$ . Буфер отбрасывали, и добавляли смесь соответствующих внутриклеточных антител (для эффекторных Т-клеток против антигенов: Ki67; для  $\mathrm{T_{reg}/NK}$ -клеток против антигенов: Ki67 и FoxP3) по  $50\,$  мкл/образец в буфере для пермеабилизации (eBioscience<sup>TM</sup>). Клетки инкубировали в течение  $30\,$  мин при  $4^\circ\mathrm{C}$ , защищая от воздействия света. Клетки промывали  $2x\,$  буфером для промывания/пермеабилизации и центрифугировали при  $2000\,$  об/мин в течение  $3\,$  мин при  $4^\circ\mathrm{C}$ . Клетки ресуспендировали в  $100\,$  мкл FACS-буфера, переносили в пробирки для FACS или  $96\mathrm{V}$ -планшеты для FACS-анализа.

Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра BD LSRFortessa $^{TM}$  (Becton Dickinson) согласно инструкциям производителя. Данные цитометрии собирали с использованием программы BD DiVA $^{TM}$  (BD BioSciences) и анализировали с использованием программы FlowJo $^{\text{®}}$  (Tree Star).

#### Определение массы влажных легких

Легкие осторожно извлекали из мышей и помещали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Определяли массу влажных легких в микроцентрифужной пробирке. Затем легкие осторожно высушивали в течение 10 часов, и высушенные легкие взвешивали в пробирках Эппендорф. Регистрировали массу влажных и сухих легких для расчета СУС, равного массе влажных легких за вычетом массы сухих легких.

## 2. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при $\it s/\it s$ и $\it n/\it k$ путях введения у яванских макак - Фармакодинамическая часть

Фармакодинамику RLI-15/SO-C101 тестировали путем оценки профилей иммунных клеток после неоднократного в/в или п/к введения яванским макакам в двух фазах.

### Фаза 1 - Сравнение в/в и п/к путей введения

В фазе 1 яванским макакам (2 самца на группу) вводили RLI-15 в 4 последовательных дня в дозах 4, 10 и 25 мкг/кг на каждое в/в (в течение 60 мин) или п/к введение в соответствии с дизайном, представленным в Таблице 2 и на Фигуре 1А. В день 5 (Д5) после ежедневного введения образцы крови (0,5 мл) собирали в К2-ЭДТА пробирки, обрабатывали, окрашивали, анализировали методом проточной цитометрии, как описано выше, и сравнивали с образцами крови, полученными в день -5 (Д-5) до

дозирования.

Таблица 2: Экспериментальные группы в фазе 1

Групп	Путь	Дни	Доза RLI	Объем RLI	Концентраци	Кол-во
a	введени	дозировани	[мкг/кг/введ]	[мл/кг/введ]	я RLI	самцов
	Я	Я			[мкг/мл]	
1	в/в	1, 2, 3, 4	4	5	0,8	2
2	в/в	1, 2, 3, 4	10	5	2	2
3	в/в	1, 2, 3, 4	25	5	5	2
4	в/в	1, 2, 3, 4	4	0,05	80	2
5	в/в	1, 2, 3, 4	10	0,05	200	2
6	п/к	1, 2, 3, 4	25	0,05	500	2
7		без	-			2
		введения				

После ежедневного дозирования RLI-15 в течение четырех последовательных дней пролиферирующие Ki67<sup>+</sup> NK и CD8<sup>+</sup> Т-клетки определяли в день 5 методом иммунофлуоресцентного анализа. Как п/к, так и в/в, введение приводит к увеличению количества пролиферирующих Ki67<sup>+</sup> NK-клеток (смотри Фигуру 1В) и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (смотри Фигуру 1С) зависимым от дозы образом (в сравнении со значениями до дозирования в день -5). Важно отметить, что п/к введение было более эффективным, чем в/в введение, в последнем случае плато было достигнуто при дозе 10 мкг/кг RLI для Ki67<sup>+</sup> NK-клеток, при этом лишь незначительное дополнительное увеличение наблюдали в диапазоне от 10 до 25 мкг/кг при в/в введении; соответственно, доза 15 мкг/кг была выбрана в качестве п/к дозы для фазы 2. Разница между п/к и в/в введением, вероятно, была вызвана различиями в фармакокинетике RLI-15 после различных путей введения. П/к введение приводило к более длительной циркуляции биологически активных сывороточных концентраций в сравнении с в/в введением, что, согласно интерпретации, приводит к более сильной активации NK и CD8<sup>+</sup> T-клеток при п/к введении.

### Фаза 2 - Сравнение 2 и 4 введений

В фазе 2, после 2-недельного периода вымывания, животным вводили препараты в течение 3 недель в соответствии с экспериментальными группами, представленными в Таблице 3 и на Фигуре 1А (начиная с Д22). Яванским макакам вводили п/к 15 мкг/кг/введение в дни исследования 22 (Д22), Д29 и Д36 (1 введение в неделю в недели 1, 2 и 3, группа 1), Д22, Д23, Д36 и Д37 (2 введения в недели 1 и 3, группа 4), Д22, Д23, Д29, Д30, Д36 и Д37 (2 введения в недели 1, 2 и 3, группы 5 и 7), и Д22-Д25 и Д36-Д39 (4 введение в Д22, Д23, Д36 и Д37 (2 введения в недели 1 и 3, группа 2), и в Д22-Д25 и Д36-Д39 (4 введения в недели 1 и 3, группа 3).

Проводили иммунофлуоресцентный анализ и дополнительное взятие образцов в

соответствии с режимом, приведенным на Фигуре 1A. Фракцию Ki67<sup>+</sup> клеток определяли в CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (NK-клетки) и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> Т-клетки) фракциях клеток. Данные получали для группы 1 (1 введение в неделю), групп 4, 5, 7 (объединенные, 2 введения в недели 1 и 3) и группы 6 (4 введения).

Количество лимфоцитов определяли в процессе гематологического анализа, количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток определяли иммунофлуоресцентным методом, и умножали их относительное содержание в составе CD45<sup>+</sup> клеток на общее количество белых клеток крови. Количество лимфоцитов определяли в процессе гематологического анализа, и количество CD8 Т-клеток и NK-клеток определяли путем умножения их относительного количества в составе CD45<sup>+</sup> клеток на общее количество белых клеток крови.

Таблица 3: Экспериментальные группы в фазе 2 (↓=инъекция)

Групп	Путь	Дни	Доза RLI	Объем RLI	Концентрац	Кол-во
a	введения	дозирования	[мкг/кг/введ]	[мл/кг/введ]	ия RLI	самцов
					[мкг/мл]	
1	п/к	1↓ в недели 1,	15	0,05	300	2
		2, 3				
2	в/в	2↓ в неделю 1	40	5	8	2
		2↓ в неделю 3				
3	в/в	4↓ в неделю 1	40	5	8	2
		4↓ в неделю 3				
4	п/к	2↓ в неделю 1	15	0,05	300	2
		2↓ в неделю 3				
5	п/к	2↓ в недели 1,	15	0,05	300	2
		2, 3				
6	п/к	4↓ в неделю 1	15	0,05	300	2
		4↓ в неделю 3				
7	п/к	2↓ в недели 1,	15	0,05	300	2
		2, 3				

Процентное содержание Ki67<sup>+</sup> (активированных) NK-клеток в общем количестве NK-клеток и Ki67<sup>+</sup> (активированных) CD8<sup>+</sup> T-клеток в общем количестве CD8<sup>+</sup> T-клеток показано на Фигуре 1D. Оптимальная активация (измеренная как Ki67<sup>+</sup>) как NK-клеток, так и CD8<sup>+</sup> T-клеток, у обезьян могла быть достигнута путем 2 ежедневных п/к введений в неделю в 2 последовательных дня, в то время как 4 ежедневных последовательных введения в течение одной недели не обеспечивали никаких дополнительных преимуществ с точки зрения активированных NK-клеток и CD8<sup>+</sup> T-клеток, при измерении в день 5 после введения. Это удивительно, учитывая короткий период полувыведения in vivo RLI-

15, составляющий всего несколько часов.

### Фаза 2 - Повторение еженедельных введений

Изучение общего количества лимфоцитов у животных из группы 5 (2 животных, анализ лимфоцитов проводили в день 5 каждой недели дозирования, то есть, Д5, Д26, Д39 и Д46) показало, что 2 ежедневных п/к введения в течение 3 недель в фазе 2 стимулировали увеличение общего количества лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток, при этом со 2-й до 3-ей недели уровни NK-клеток и CD8+ Т-клеток сохранялись, но не увеличивались (смотри Фигуру 1E). Соответственно, повторение для обезьян 2 ежедневных введений в 2 последовательных дня один раз или два раза, то есть, в течение 2 или 3 недель, считали оптимальным, так как плато было достигнуто на 3-ей неделе и дополнительной пользы от дальнейшего повторения не ожидалось.

#### Фаза 1 и фаза 2 - повторение месячных циклов

Учитывая тот факт, что после перерыва во введении между фазой 1 и фазой 2 NK-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки могли быть вновь активированы через 18 дней после последнего введения (день 22 - день 4), предполагалось, что 2 или 3 повторения 2 ежедневных введений в последовательные дни можно вновь выполнять после перерыва во введении, составляющего примерно 5-20 дней.

### Фаза 2 - Сравнение активации клеток и размножения клеток

На Фигуре 1F-I показана либо клеточная активация на основании Ki-67<sup>†</sup> NK-клеток (F) и Ki-67<sup>†</sup> CD8+ Т-клеток (H) (в каждом случае в процентах от общего количества NK-клеток или CD8<sup>†</sup> Т-клеток, соответственно), либо клеточное размножение NK-клеток (G) и CD8<sup>†</sup> Т-клеток (I) (в виде количества клеток) у животных 69 и 70 (группа 5). Импульсное дозирование с 2 последовательными введениями суточных доз в фазе 2 приводит к сильной активации как NK-клеток, так и CD8<sup>†</sup> Т-клеток, которая вновь резко снижается в течение 5-дневных перерывов во введении. Как во 2-м, так и в 3-ем цикле, введение 2 доз приводило к новой активации NK-клеток и CD8<sup>†</sup> Т-клеток, в случае NK-клеток с тенденцией к более слабой активации в последних циклах. Изучение размножения NK-клеток и CD8+ Т-клеток у одного и того же животного показало, что 2 первых цикла с 2 ежедневными последовательными дозами приводят к стабильному увеличению количества клеток, при этом 3-й цикл не приводит к дальнейшему увеличению, в случае животного 70 количество NK-клеток даже снижалось после 3-го цикла дозирования в фазе 2.

## 3. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при в/в и п/к путях введения у яванских макак - плотное дозирование

В отдельном эксперименте было протестировано, приводит ли введение 4 суточных доз RLI-15/SO-C101 в 4 последовательных дня в 4 недельных циклах к улучшению фармакодинамических эффектов. RLI-15 в дозе 100 мкг/кг вводили п/к инъекцией 1 самке и 1 самцу яванских макак в 4 последовательных дня (Д1-4; Д8-11, Д15-18, Д22-25). Фармакодинамическую активность оценивали в дни 5, 12, 19 и 26. Оценку абсолютного и относительного количества лимфоцитов по подгруппам в периферической

крови всех животных проводили методом проточной цитометрии. Абсолютное количество лимфоцитов по подгруппам определяли с использованием пробирок BD TruCount<sup>TM</sup> и регистрировали как NK-клетки (CD16<sup>+</sup>) - CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, суммарные Тлимфоциты (CD3<sup>+</sup>) - CD3<sup>+</sup>, хелперные Тлимфоциты (CD4) - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, цитотоксические Тлимфоциты (CD8<sup>+</sup>) - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> и Влимфоциты (CD20<sup>+</sup>) - CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>, в каждом случае в виде количества клеток на мкл цельной крови (Фигура 2).

Изучение количества NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Фигура 2) показало, что 1-й цикл из 4 суточных доз в 4 последовательных дня приводит к сильному размножению лимфоцитов, с возрастанием количеств NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Однако уже после 2-го цикла количество лимфоцитов, NK-клеток и CD8+ Т-клеток уменьшалось, что также продолжалось в 3-м и 4-м циклах. При сравнении этих результатов с результатами менее плотного режима дозирования, представленного на Фигуре 1E, где увеличенное/высокое количество клеток наблюдалось у получавших препарат обезьян в течение 3 циклов, становится ясно, что при очень плотном и непрерывном режиме с 4 последовательными введениями в неделю не наблюдается никаких преимуществ для размножения NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

### 4. Корреляция результатов для человека/in vitro и для яванских макак/in vivo

Пролиферацию in vitro популяций иммунных клеток периферической крови, полученных от человека и яванских макак, после воздействия RLI-15/SO-C101 определяли методом проточной цитометрии для расчета полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) RLI-15 для пролиферации NK и CD8<sup>+</sup> T-клеток человека и яванских макак, а также 10% и 90% эффективных концентраций (EC10, EC90).

Наблюдалась сильная корреляция между активацией NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток in vitro и in vivo, как показано на Фигуре 3. Связь между концентрацией и ответом in vitro хорошо коррелировала со связью между С<sub>тах</sub> после п/к введения и уровнями активации NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток у яванских макак. Например, RLI-15 в концентрации 4 мкг/кг и соответствующая С<sub>тах</sub> 1,2 нг/мл (примерно 48 пМ) приводили к 71% активированных NK-клеток и 18% активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Аналогичные уровни активации были достигнуты in vitro в случае 0,93 нг/мл (примерно 37 пМ) с человеческими NK-клетками (64%) и CD8<sup>+</sup> Т-клетками (17%) (Фигура 3). Ответ на эту дозу и концентрацию использовали для определения минимального ожидаемого уровня эффекта (MABEL), диапазона фармакологически активных доз (PAD), наряду с уровнем отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений (NOAEL) и максимальной переносимой дозой (МТD), для выбора начальной дозы и этапов эскалации дозы для клинического исследования SC103 (Фигура 3).

Минимальную активацию NK-клеток и отсутствие активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдали при концентрации RLI-15, составляющей 0,1 нг/мл (примерно 4 пМ) in vitro (Фигура 3). Эту концентрацию считали MABEL. Дозу 0,7 мкг/кг экстраполировали для достижения такой  $C_{max}$  0,1 нг/мл, исходя из наблюдаемой взаимосвязи между п/к дозой и  $C_{max}$ . Занятость рецепторов (RO), рассчитанная для этой дозы, составляет от 0,5% до 2%,

учитывая  $K_D$  200 пМ и 800 пМ, соответственно. Диапазон фармакологически активных доз составляет от 1,5 мкг/кг до 25 мкг/кг, что соответствует  $C_{max}$  от 0,3 нг/мл (примерно 12 пМ) до 14 нг/мл (примерно 560 пМ) и RO от 1,5% до 6% и 40% и 65%, соответственно. Наблюдали от 50% активации NK-клеток, но без активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в нижнем конце, до полной активации NK и CD8+ Т-клеток в верхнем конце этого диапазона доз. NOAEL 80 мкг/кг и MTD 100 мкг/кг после п/к введения были рассчитаны для стимуляции RO от 80% до 95%. Вышеприведенные дозы для яванских макак были пересчитаны в соответствующие дозы для человека путем аллометрического масштабирования с использованием поправочного коэффициента 3,1 (CDER 2005).

Поскольку активация NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток является более чувствительным чем занятость рецепторов, фармакологическую активность определенную in vitro и у яванских макак, использовали для определения начальной дозы и этапов эскалации дозы, запланированных для клинического исследования SC103. Соответственно, была выбрана начальная доза 0,25 мкг/кг (Фигура 3). Ожидается, что эта доза, представляющая МАВЕL, будет стимулировать активацию примерно 20% NKклеток, не затрагивая CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Последующие уровни дозы, показанные на Фигуре 3, были выбраны для постепенного повышения активации NK-клеток и для стимуляции активации  $CD8^+$  Т-клеток до 60% и  $\leq$ 10% на уровне дозы 2 и 80% и 25% на уровне дозы 3, соответственно, с достижением активации 100% NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток на уровне дозы 6. Последующие уровни дозы планируется увеличивать на 66%, 60% и 50%. Уровень дозы 7 все еще будет ниже человеческого эквивалента NOAEL (26 мкг/кг). Эскалация дозы в исследовании SC103 будет зависеть от степени безопасности, наблюдаемой на каждом уровне дозы. Кроме того, параметры ФК, а также активации NK и CD8+ Т-клеток, анализируемые у пациентов в группе каждой дозы, будут учтены при принятии решения об эскалации дозы.

### 5. План последующего исследования фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при п/к пути введения у яванских макак

Аналогично схеме, описанной в примере 2, планируется дальнейшее тестирование режимов дозирования для п/к введения RLI-15/SO-C101:

Недел		Группы						
Я	1	2	3	4	5	6		
1	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1		
2	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1		
3	-	Д1, Д2	-	-	-	Д1		
4	Д1, Д2	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	-	Д1		
5	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1		
6	-	Д1, Д2	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	Д1		
7	Д1, Д2	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	-	Д1		

8	Д1, Д2	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	-	Д1
9	-	-	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	-
10	-	-	Д1, Д2	-	Д1, Д2, Д3, Д4	-

Дх означает введение RLI-15 в день х соответствующей недели, например, Д3 в неделю 6 означает введение RLI-15 в 3-й день недели 6.

#### 6. Фармакодинамика у мышей при разных дозах

Определяли дозу RLI-15, проявляющую максимальную активность в отношении NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Мышам вводили инъекцией RLI-15 (SO-C101, RLI2) в/б или п/к в возрастающих концентрациях 10, 20, 35 и 50 мкг/дозу один раз в день в течение 4 последовательных дней. В день 5 легкие собирали, выделяли спленоциты и определяли относительное размножение NK-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток) методом проточной цитометрии в день 5 (Фигура 4).

RLI-15 при всех протестированных концентрациях индуцировал сильное размножение NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (смотри Фигуру 4A и B). При том, что максимальное размножение NK-клеток наблюдалось, когда мышам вводили 20 мкг/дозу, максимальное размножение CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти достигалось, когда мышам вводили 35 мкг/дозу. При любой протестированной дозе RLI-15 отсутствовало размножение регуляторных Т-клеток (смотри Фигуру 4C). Интересно, что размножение NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти у мышей, которым вводили RLI-15 в количестве 50 мкг/дозу, продемонстрировало тенденцию к снижению в сравнении с более низкой концентрацией RLI-15 35 мкг/дозу. Не было значительных различий в относительном размножении NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти при введении RLI-15 в/б или п/к путем введения в любой протестированной концентрации. И наконец, не наблюдалось значительного увеличения массы легких в качестве показателя синдрома утечки сосудов (СУС) в день 5 (смотри Фигуру 4D).

### Фаза 2 - Сравнение 2 двухнедельных циклов в/в введения и 2 двухнедельных циклов п/к введения 4 доз

На Фигуре 1J-М приведено сравнение процентного содержания Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток и количеств Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток в случае 2 двухнедельных циклов введения 4 в/в доз, каждая 40 мкг/кг RLI-15 (группа 3 с животными 65 и 66), и 2 п/к доз, каждая 15 мкг/кг RLI-15 (группа 4 с животными 67 и 68). Для тех же групп показано процентное содержание Ki-67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-клеток и количество Ki-67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-клеток (Фигура 1 N-Q).

Активация NK-клеток, измеренная как процент Ki-67<sup>+</sup> от всех NK-клеток, была по меньшей мере сопоставима в случае 2 суточных доз в 2 последовательных дня с введением 15 мкг/кг RLI-15 п/к (всего 60 мкг/кг) и 4 суточных доз в 4 последовательных дня с введением 40 мкг/кг RLI-15 в/в (всего 320 мкг/кг), с тенденцией, заключающейся в том, что в/в активация снижалась во 2-м цикле, в то время как п/к активация была одинаковой в 1-м и 2-м циклах (Фигура 1 J и L). Активация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, судя по всему,

была сильнее в случае 2 п/к введений RLI-15, достигая показателя более 20% активированных CD8 $^+$  T-клеток, в то время как 4 в/в дозы приводили к менее чем 20% активированных CD8 $^+$  T-клеток (Фигура 1 N и P). С другой стороны, 4 в/в дозы, очевидно индуцировали более постоянное увеличение количества CD8 $^+$  T-клеток (Фигура 1 О и Q).

Подводя итоги, 2 п/к дозы RLI-15 в 2 последовательных дня по меньшей мере сопоставимы с 4 в/в дозами в 4 последовательных дня.

# 7. Эффективность в/б введения RLI-15 с разными режимами в модели метастатической опухоли Renca

Антиметастатическую активность RLI-15 в дозе 20 мкг исследовали в мышиной модели почечноклеточного рака (RENCA, BALB/c, самки) (14 или 16 мышей/группу, 8 мышей - прогрессирование опухоли, 6 или 8 мышей - фармакодинамика). Суточную дозу RLI-15 (SO-C101, RLI2) в 200 мкл солевого раствора вводили в соответствии с разными режимами введения, начиная с дня 1 (Д1) в/б путем введения после того, как 10<sup>5</sup> клеток опухоли RENCA (в 300 мкл солевого раствора) вводили в/в инъекцией в хвостовую вену в день 0. Легкие, содержащие метастазы, взвешивали в день 16 (смотри Фигуру 5A). Тестировали следующие группы/режимы:

- 0) не подвергнутые воздействию: без введения
- 1) только Renca  $5 \times 10^5$
- 2) Renca  $5 \times 10^5 + 20$  мкг RLI2 в/б Д1-4+Д8-11
- 3) Renca  $5 \times 10^{5+20}$  мкг RLI2 в/б Д1-4
- 4) Renca  $5 \times 10^5 + 20$  мкг RLI2 в/б Д1-2+Д8-9
- 5) Renca  $5 \times 10^{5+20}$  мкг RLI2 в/б Д1+Д8.

FACS-анализ проводили в день 5 и день 12. Массу тела и выживаемость мышей контролировали 2-3 раза/неделю, в день 16 мышей умерщвляли, легкие собирали и оценивали их массу после кратковременного контакта с фильтровальной бумагой для удаления избыточной поверхностной жидкости.

Таблица 4: Данные по массе легких в день 16 (8 мышей на группу)

	среднее/г	% уменьшения
Контроль с опухолью	0,67	
RLI-15 20 мкг в/б Д1-Д4+Д8-11	0,22	67%
RLI-15 20 мкг в/б Д1-Д4	0,23	66%
RLI-15 20 мкг в/б Д1-2+Д8-9	0,32	52%
RLI-15 20 мкг в/б Д1+Д8	0,40	40%

RLI-15 при введении в суточной дозе 20 мкг в/б вызывал уменьшение количества метастазов в легких на примерно 70% в сравнении с контрольными мышами с опухолью (смотри Таблицу 4 и Фигуру 5В), при этом режимы с неоднократным дозированием в Д1-Д4 были более эффективными, чем дозирование в Д1-Д2+Д8-Д9 и Д1+Д8. Две 4-дневные серии дозирования (Д1-Д4+Д8-Д11) не приводили к значительно лучшим результатам, чем одна 4-дневная серия (Д1-Д4). 4 суточные дозы в 4 последовательных дня (Д1-Д4),

судя по всему, действовали лучше, чем при распределении доз на две недели (Д1-Д4+Д8-Д11).

Пролиферацию NK-клеток и CD8+ Т-клеток памяти оценивали в день 5 и день 12 для 2 мышей на группу (смотри Фигуру 5D и E) путем анализа спленоцитов на относительное размножение иммунных клеток. Введение RLI-15 индуцировало сильную пролиферацию иммунных клеток обоих типов, которая сохранялась в день 12 после начала введения. Дозирование в Д1-Д4 (режимы Д1-Д4 и Д1-Д4+Д8-Д11, идентичные до дня 5) приводило к сильному размножению NK-клеток и CD8 клеток в день 5, в значительно большей степени, чем режимы с меньшим количеством введений, до дня 5 (Д1-Д2 и Д1). При режиме введения в Д1-Д4 недели наблюдали самую высокую фармакодинамическую (ФД) активность в отношении размножения NK и CD8+ Т-клеток, которую определяли в день 12, и которая превосходила результаты в случае 2-недельных режимов введения (во втором раунде введения RLI-15 не наблюдали дополнительного улучшения ФД). Введение в Д1+Д8 или в Д1-Д2+Д8-Д9 приводило к более низкому ФД эффекту. Аналогичные эффекты наблюдали для активированной подгруппы этих клеток (Кi-67+).

СУС не был индуцирован в день 5 при введении RLI-15. Введение RLI-15 в соответствии со всеми режимами предотвращало потерю массы тела мышей, вызываемую опухолевой нагрузкой (контроль), данные не представлены.

Интересно, что размножение как NK-клеток, так и CD8+ Т-клеток (которое было наилучшим при режимах Д1-Д4 и Д1-Д4+Д8-Д11), очень сильно коррелировало с эффективностью лечения с точки зрения лечения метастазов в легких, таким образом, являясь подходящим суррогатным маркером эффективности.

### 8. Эффективность п/к введения RLI-15 в разных дозах в модели метастатической опухоли Renca

Антиметастатическую активность RLI-15 (SO-C101, RLI2) в дозах 10 мкг или 20 мкг изучали в мышиной модели почечноклеточного рака (RENCA, BALB/c, самки) в сравнении со слитым белком из (IL-15R $\alpha$  sushi)2Fc в нековалентной связи с двумя мутеинами IL-15N72D (с такой же последовательностью, как описанная для ALT-803 в US 2017/0088597, далее в настоящем документе IL15N72D:IL15R $\alpha$ sushi-Fc или, более точно, (IL15N72D)2:IL15R $\alpha$ sushi-Fc) (8 мышей/группу). Суточную дозу 10 мкг или 20 мкг RLI-15 (RLI2) в 200 мкл солевого раствора или 5 мкг IL15 $_{\rm N72D}$ :IL15R $\alpha$ sushi-Fc вводили в соответствии с разными режимами, начиная в день 1 (Д1), п/к путем введения после того, как  $10^5$  клеток опухоли RENCA (в 300 мкл солевого раствора) вводили в/в инъекцией в хвостовую вену в день 0. Тестировали следующие группы/режимы:

- 0) не подвергнутые воздействию: без введения
- 1) только Renca  $5 \times 10^5$
- 2) Renca  $5 \times 10^5 + 20$  мкг RLI2 п/к Д1-4
- 3) Renca  $5 \times 10^{5+10}$  мкг RLI2 п/к Д1-4
- 4) Renca  $5 \times 10^5 + 20$  мкг RLI2 п/к Д1-3

5) Renca  $5\times10^5+5$  мкг IL15 $_{N72D}$ :IL15 $R\alpha_{sushi}$ -Fc п/к Д1

 $IL15_{N72D}$ : $IL15R\alpha_{sushi}$ -Fc вводили в меньшей дозе и реже вследствие более высокого ожидаемого периода полувыведения.

Массу тела и выживаемость мышей контролировали до умерщвления мышей в день 16 (смотри Фигуру 6В). Легкие собирали в день 16 и, после кратковременного контакта с фильтровальной бумагой для удаления избыточной поверхностной жидкости, определяли массу легких в качестве меры метастазирования в легких (смотри Таблицу 5 и Фигуру 6А).

Таблица 5: Данные по массе легких в день 16 (8 мышей на группу)

	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	10 0/
	среднее/г	% уменьшения
Контроль с опухолью	0,53	
RLI-15 20 мкг п/к Д1-Д4	0,25	53%
RLI-15 10 мкг п/к Д1-Д4	0,32	40%
RLI-15 20 мкг п/к Д1-Д3	0,26	51%
IL15 <sub>N72Д</sub> :IL15Rα <sub>sushi</sub> -Fc 5 мкг Д1	0,20	62%

RLI-15 демонстрировал значительную антиметастатическую активность при всех п/к вводимых дозах и режимах, приводя к значительному уменьшению массы легких в день 16. Судя по всему, дозы 20 мкг при введении либо в Д1-Д4, либо в Д1-Д3, были более эффективны, чем 10 мкг с режимом введения в Д1-Д4, и были почти так же эффективны, как 5 мкг IL15 $_{\rm N72D}$ :IL15 $_{\rm R\alpha_{sushi}}$ -Fc, который вводили один раз в Д1. Кроме того, эффективность всех вариантов введения подтверждалась отсутствием потери (в случае IL15 $_{\rm N72D}$ :IL15 $_{\rm R\alpha_{sushi}}$ -Fc) или относительно небольшой потерей (в случае RLI-15) массы тела у мышей в сравнении с не получавшими лечение мышами.

#### 9. Клиническое исследование RLI-15/SO-C101

Первое многоцентровое открытое исследование фазы 1/1b с участием людей для оценки безопасности и предварительной эффективности SO-C101 в качестве монотерапии и в сочетании с пембролизумабом у пациентов с выбранными запущенными/метастатическими солидными опухолями было утверждено и скоро начнется (EurdraCT номер 2018-004334-15). RLI-15 будет введен п/к в начальной дозе 0,25 мкг/кг и вплоть до 48 мкг/кг. В комбинированной части клинического исследования RLI-15 будет объединен с кейтруда пембролизумабом в дозе 25 мг/мл, который будет введен в/в в дозе 200 мг.

В данном исследовании будет оцениваться безопасность и переносимость SO-C101, вводимого в качестве монотерапии (часть A) и в сочетании с анти-PD-1 антителом (пембролизумаб) (часть B) у пациентов с выбранными рецидивирующими/рефрактерными запущенными/метастатическими солидными опухолями (почечно-клеточная карцинома, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, меланома, карцинома из клеток Меркеля, плоскоклеточная карцинома кожи, солидные опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью, трижды негативный рак

молочной железы, мезотелиома, рак щитовидной железы, рак тимуса, рак шейки матки, рак желчных путей, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников, рак желудка, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак анального канала), у которых имеет место рефрактерность или непереносимость существующих методов лечения, обеспечивающих клиническую пользу для их состояния.

**Часть А** начнется монотерапией SO-C101 с эскалацией дозы от 0,25 мкг/кг до 48 мкг/кг SO-C101, вводимой п/к, и будет продолжаться до определения максимальной переносимой дозы (MTD) и/или рекомендованной для фазы 2 дозы (RP2D) SO-C101 в качестве монотерапии. Пациенты будут получать SO-C101 в день 1 (±1 день; среда), день 2 (четверг), день 8 (среда) и день 9 (четверг) 21-дневного цикла (Фигура 7А). Начало лечения (день 1) по мере возможности запланировано на среду, чтобы обеспечить возможность сбора образцов для определения биомаркеров (свежие мононуклеарные клетки периферической крови [МКПК] передают в центральную лабораторию) в рабочие дни. Однако, когда две дозы в неделю вводят в последовательные дни (день 1 и день 2), и дозирование во вторую неделю (день 8 и день 9) происходит через 7 дней после дня 1, будет вариативность  $\pm 1$  день для дня 1 дозирования, которое может происходить во вторник или в четверг. Монотерапия с эскалацией дозы будет продолжена до достижения MTD и/или RP2D в соответствии со схемой эскалации дозы. Если MTD не будет достигнута в группах после завершения запланированной эскалации дозы, набор в исследование будет прекращен для оценки RP2D. Пациенты, включенные в исследование в части А, продолжат лечение на назначенном им уровне дозы. Участие пациентов в исследуемом лечении будет прекращено в случае одного из следующих событий: (i) радиографическое прогрессирование заболевания; (іі) клиническое прогрессирование заболевания (по оценке исследователя); (ііі) НЯ (интеркуррентное заболевание или токсичность, связанная с лечением в рамках исследования, включая ограничивающую дозу токсичность, которая, по мнению исследователя, в значительной степени повлияет на оценку клинического состояния или потребует прекращения лечения в рамках исследования).

Запланированной начальной дозой в части В будет доза 1,5 мкг/кг SO-C101, вводимая как в части А, которая будет объединена с фиксированной дозой пембролизумаба (200 мг в/в каждые 3 недели). Пациенты будут получать возрастающие дозы SO-C101 в день 1 (±1 день) (среда), день 2 (четверг), день 8 (среда) и день 9 (четверг) вместе с фиксированной дозой пембролизумаба (200 мг в/в каждые 3 недели), вводимой в день 1 введения SO-C101 (Фигура 7В). Пембролизумаб будет введен в пределах 30 минут после первой дозы SO-C101, и как указано в инструкции к препарату. Начало лечения (день 1) по мере возможности запланировано на среду, чтобы обеспечить возможность сбора образцов для определения биомаркеров (свежие мононуклеарные клетки периферической крови [МКПК] передают в центральную лабораторию) в рабочие дни. Однако, когда две дозы SO-C101 в неделю вводят в последовательные дни (день 1 и день 2), и дозирование SO-C101 во вторую неделю (день 8 и день 9) происходит через 7 дней

после дня 1, будет вариативность ±1 день. Пациенты будут продолжать лечение SO-C101 и пембролизумабом на назначенном уровне дозы SO-C101. В случае, если введение SO-C101 будет необходимо остановить по причинам, отличным от прогрессирования заболевания, лечение пембролизумабом можно будет продолжать до 1 года по оценке DEC, если у пациента отсутствует прогрессирование заболевания и он может переносить лечение. В случае необходимости остановки введения пембролизумаба лечение SO-C101 можно будет продолжать до прогрессирования заболевания или развития неприемлемой токсичности. Участие пациентов в исследуемом лечении будет прекращено в случае одного из следующих событий: (i) радиографическое прогрессирование заболевания; (ii) клиническое прогрессирование заболевания (по оценке исследователя); (iii) НЯ (интеркуррентное заболевание или токсичность, связанная с лечением в рамках исследования, включая ограничивающую дозу токсичность, которая, по мнению исследователя, в значительной степени повлияет на оценку клинического состояния или потребует прекращения лечения в рамках исследования).

### 10. Уничтожение опухолевых клеток in vitro в результате <u>одновременного</u> применения сочетания RLI-15 и даратумумаба

Человеческие МКПК выделяли путем разделения в градиенте фиколла из лейкоцитарных пленок 5 здоровых доноров крови. Выделенные человеческие МКПК  $(1 \times 10^6)$  инкубировали с RLI-15 (SO-C101) в концентрации 1 нМ, даратумумабом в концентрациях 0,1,1 и 10 нM, и DiD-мечеными (DiD-мечение Vybrant<sup>®</sup>, ThermoFisher согласно инструкциям производителя) опухолевыми клетками Daudi (40000 клеток/лунку) в течение 20 ч при 37°С (соотношение Э:М 25:1) с сывороткой, инактивированной нагреванием (20 мин, 56°C - ИН сыворотка). Затем клетки окрашивали смесью флуоресцентно меченых антител и DAPI, как показано в Таблице 6 (LAMP-1 был исключен из окрашивания из-за позднего времени анализа этого маркера дегрануляции). Процентное содержание мертвых (DAPI-положительных)  $DiD^+$  клеток Daudi определяли методом проточной цитометрии. Маркеры иммунных клеток использовали для различения чМКПК и опухолевых клеток Daudi. Мечение DiD клеток Daudi проводили перед совместным культивированием с человеческими МКПК. DiD в концентрации 5 мкл/ $1 \times 10^6$  клеток добавляли к опухолевым клеткам Daudi в бессывороточной среде RPMI и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Клетки дважды промывали (5 мин, 1500 об/мин) средой RPMI, содержащей ЭТС.

Таблица 6: Метки для проточной цитометрии

	Маркер	Флуорохром	мкл/образе	Клон	Каталожный	Поставщик
			Ц		№	
	LAMP-1	PE	3	H4A3	1P-671-T100	EXBIO
NK-	(CD107a)					
клетки	CD45	BV605	1	HI30	564047	BD
	CD3	APC ef780	1	OKT3	47-0037-42	Thermo

	CD8	PE-Dylight	1	MEM-31	T5-207-T100	EXBIO
	CD16	PE-Cy7	1	3G8	302016	BioLegend
	CD56	FITC	2	MEM-	1F-231-T100	EXBIO
				188		
Daudi	DiD	APC	5 мкл/1 M		D7757	Thermo
	DAPI	Pac blue	1,2			

При том, что присутствие RLI-15 или присутствие 0,1 нМ даратумумаба приводило лишь к незначительному увеличению количества мертвых опухолевых клеток (увеличению от примерно 15% до примерно 18% или 20%, соответственно), сочетание RLI-15 с 0,1 нМ даратумумабом приводило к более существенному увеличению количества мертвых опухолевых клеток (примерно 26%). Сравнительно более высокое количество мертвых клеток наблюдалось при увеличении концентрации даратумумаба до 1 нМ, тогда как, по-видимому, при данном значении было достигнуто насыщение, поскольку при использовании 10 нМ даратумумаба дальнейшего увеличения не наблюдалось. Кроме того, присутствие RLI-15 всегда приводило к увеличению количества мертвых опухолевых клеток в сравнении с соответствующей группой без RLI-15 (смотри Фигуру 8).

В заключение, RLI-15 при одновременном использовании проявляет синергию с даратумумабом в уничтожении опухолевых клеток Daudi in vitro.

# 11. Уничтожение опухолевых клеток in vitro в результате <u>последовательного</u> применения сочетания RLI-15 и даратумумаба

Человеческие МКПК выделяли путем разделения в градиенте фиколла из лейкоцитарных пленок 6 здоровых доноров крови. Выделенные человеческие МКПК  $(1\times10^6)$  инкубировали с RLI-15 (SO-C101) в концентрации 1 нМ при  $37^{\circ}$ С в течение 48 ч. Затем стимулированные МКПК инкубировали в отсутствие, или в присутствии, даратумумаба в возрастающих концентрациях  $(0,1,\ 1\$ или  $10\$ нМ) и DiD-меченых опухолевых клеток Daudi (40000/лунку) при  $37^{\circ}$ С в течение 4 ч (соотношение  $9:M\ 1:1)$  с использованием либо активной сыворотки, либо сыворотки, инактивированной нагреванием  $(20\$ мин,  $56^{\circ}$ С). Затем клетки окрашивали смесью флуоресцентно меченых антител и DAPI, как показано в Таблице 6. Процентное содержание мертвых (DAPI-положительных) DiD+ клеток Daudi определяли методом проточной цитометрии. Маркеры иммунных клеток использовали для различения чМКПК и опухолевых клеток Daudi. Мечение DiD клеток Daudi проводили перед совместным культивированием с человеческими МКПК. DiD в концентрации  $5\$ мкл/ $1\times10^6$  клеток добавляли к опухолевым клеткам Daudi в бессывороточной среде RPMI и инкубировали при  $37^{\circ}$ С в течение  $30\$ мин. Клетки дважды промывали  $(5\$ мин,  $1500\$ об/мин) средой RPMI, содержащей 3TС.

Аналогично варианту совместного применения, описанному в примере 10, добавление даратумумаба приводило к синергическому увеличению количества мертвых опухолевых клеток, при этом в инактивированной нагреванием (ИН) сыворотке

практически не наблюдалось дополнительное увеличение при возрастании концентрации от 0,1 нМ до 1 нМ, и увеличение отсутствовало при возрастании концентрации даратумумаба от 1 нМ до 10 нМ, но, напротив, % мертвых опухолевых клеток дополнительно увеличивался до >60% в случае инкубации в активной сыворотке, это указывает на дополнительный синергический эффект с активным комплементом (комплементзависимая цитотоксичность - CDC). Соответственно, RLI-15 и даратумумаб синергически уничтожали клетки Daudi также при последовательном применении in vitro (смотри Фигуру 9).

### 12. Противоопухолевая эффективность при <u>одновременном</u> применении сочетания RLI-15 и даратумумаба для лечения множественной миеломы in vivo

Мышам CB17 SCID инокулировали  $\pi/\kappa$   $1\times10^7$  клеток миеломы RPMI8226, создавая разработанную модель множественной миеломы. Лечение начинали в день 0 (день рандомизации, объем опухоли  $\sim100$  мм³). RLI-15 вводили  $\pi/\kappa$  в дозе 1 мг/кг в дни 0, 1, 2 и 3, и даратумумаб вводили в/б в дозе 20 мг/кг в день 4, по одной группе животных для введения отдельно RLI-15 (SO-C101) или отдельно даратумумаба, и одной группе вводили сочетание. В качестве контроля вводили солевой раствор в количестве 10 мкл/г  $\pi/\kappa$  в дни 0, 1, 2 и 3. Использовали по 10 животных на группу.

В то время как у контрольных животных, получавших солевой раствор, наблюдалось стабильное увеличение среднего объема опухолей (черная сплошная линия на Фигуре 10A), в обеих группах введения RLI-15 и даратумумаба в качестве монотерапии имело место уменьшение роста опухолей (серая пунктирная линия для даратумумаба и черная пунктирная линия для RLI-15 на Фигуре 10A), комбинированное лечение RLI-15 и даратумумабом даже приводило к синергическому уменьшению объема опухолей (серая сплошная линия в Фигуре 10A). Если рассматривать отдельных животных, то комбинированное лечение RLI-15 и даратумумабом приводило к отторжению опухолей у всех подопытных животных, в то время как монотерапия RLI-15 - только у 25% подопытных животных. Как в контрольной группе, так и в группе введения даратумумаба, ни у одного из подопытных животных не произошло отторжение опухоли (смотри Фигуру 10B, серая сплошная линия для группы введения сочетания, черная пунктирная линия для RLI-15; кривые для контрольной группы введения солевого раствора и группы введения даратумумаба совпадают с осью х).

Соответственно, синергическое взаимодействие RLI-15 и даратумумаба, наблюдаемое in vitro, было подтверждено in vivo в модели множественной миеломы RPMI8226 в условиях одновременного применения.

# 13. Противоопухолевая эффективность при <u>последовательном</u> применении сочетания RLI-15 и даратумумаба для лечения множественной миеломы in vivo

Как и в примере 12, мышам CB17 SCID инокулировали  $\pi/\kappa$   $1\times10^7$  клеток миеломы RPMI8226. Лечение начинали в день 0 (день рандомизации, объем опухоли  $\sim100$  мм<sup>3</sup>). Даратумумаб вводили в/б в дозе 20 мг/кг в день 0, при этом в данной схеме последовательного введения RLI-15 (SO-C101) вводили  $\pi/\kappa$  в дозе 1 мг/кг в дни 7, 8, 9 и

10. В качестве контроля вводили солевой раствор в количестве 10 мкл/г  $\pi$ /к в дни 0, 1, 2 и 3. Использовали по 10 животных на группу.

Опять-таки, в группе контрольных животных, получавших солевой раствор, наблюдалось постоянное увеличение объема опухолей (черные кружки на черной сплошной линии, Фигура 11А). В этих условиях с поздним началом лечения в день 7 в группе введения RLI-15 в качестве монотерапии наблюдалось лишь небольшое уменьшение роста опухолей (черные кружки на черной пунктирной линии), при этом как в группе введения даратумумаба в качестве монотерапии (лечение было начато в день 0, серой пунктирной незаштрихованные кружки на линии), так И комбинированного введения даратумумаба с RLI-15 (серые кружки на серой сплошной линии, совпадающей с серой пунктирной линией), имело место уменьшение объема опухолей (смотри Фигуру 11А). При том, что в этом варианте с последовательным введением не было обнаружено никакой разницы между группами введения сочетания даратумумаб+RLI-15 и только даратумумаба, и как сочетание, так и отдельно даратумумаб, приводили к полному отторжению опухолей у всех подопытных животным примерно к дню 28, примерно у 25% мышей, которым вводили только даратумумаб, вновь развились опухоли после дня 28 (смотри серую пунктирную линию для введения только даратумумаба в сравнении с серой сплошной линией для комбинированного лечения, Фигура 11В).

Таким образом, уменьшение объема опухоли, индуцированное сочетанием RLI-15 и даратумумаба, было аналогичным в случае применения монотерапии даратумумабом (А), однако комбинированное лечение приводило к быстрой и стойкой регрессии опухоли у всех получавших лечение животных в отличие от введения только даратумумаба, после которого у некоторых животных позже вновь развились опухоли. Соответственно, последовательное применение сначала даратумумаба, а затем RLI-15, с началом введения на одну неделю позже, приводит к важному терапевтическому улучшению.

### 14. Клиническое исследование RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом

Запланировано клиническое исследование для оценки безопасности и предварительной эффективности RLI-15/SO-C101 в сочетании с даратумумабом.

Начальные 8 недель лечения

Следуя 3-недельному циклу введения SO-C101, SO-C101 будут вводить п/к в дозе, установленной на основе примера 9, в день 1 и день 2 (неделя 1), а также день 8 и день 9 (неделя 2), с последующей одной неделей без введения SO-C101. Даратумумаб будут вводить в/в инфузией в дозе 16 мг/кг один раз в неделю. Инфузию будут выполнять либо в 3-й день каждой недели (то есть, день 3, день 10 и день 17), либо в 1-й день каждой недели (то есть, день 8 и день 15). Лечение в соответствии с этой схемой будут продолжать в течение 8 недель (то есть, 8 доз даратумумаба), как показано на Фигуре 12 А (с введением даратумумаба каждый 3-й день каждой недели) и В (с введением даратумумаба каждый 1-й день каждой недели).

Альтернативно, следуя установленному 4-недельному циклу введения

даратумумаба, SO-C101 будут вводить п/к в дозе, установленной на основе примера 9, в день 1 и день 2 (неделя 1), а также день 8 и день 9 (неделя 2), с последующими двумя неделями без введения SO-C101. Даратумумаб будут вводить в/в инфузией в дозе 16 мг/кг один раз в неделю. Инфузию будут выполнять либо в 3-й день каждой недели (то есть, день 3, день 10, день 17 и день 24), либо в 1-й день каждой недели (то есть, день 1, день 8, день 15 и день 22). Лечение в соответствии с этой схемой будут продолжать в течение 8 недель (то есть, 8 доз даратумумаба), как показано на Фигуре 13 А (с введением даратумумаба каждый 1-й день каждой недели).

#### Недели 9-24 лечения

В следующие недели лечения SO-C101 будут вводить п/к в дозе, установленной на основе примера 9, в день 1 и день 2 (неделя 1), а также день 8 и день 9 (неделя 2), с последующими двумя неделями без введения SO-C101. Даратумумаб будут вводить в/в инфузией в дозе 16 мг/кг один раз в неделю в течение 2 недель, с последующими 2 неделями без введения даратумумаба, в 4-недельном цикле. Опять-таки, даратумумаб будут вводить либо в 3-й день каждой недели (то есть, день 3 и день 10), либо в 1-й день каждой недели (то есть, день 1 и день 8), и лечение будут продолжать в течение 16 недель, то есть, до завершения 24-й недели общего курса лечения. Режим лечения представлен на Фигуре 14 А (с введением даратумумаба каждый 3-й день каждой недели лечения даратумумабом) и В (с введением даратумумаба каждый 1-й день каждой недели лечения даратумумабом).

### От недели 25 до прогрессирования заболевания

Начиная с недели 25 общего курса лечения, даратумумаб будут только вводить в/в инфузией в дозе 16 мг/кг один раз каждые 4 недели, либо в день 3 такого 4-недельного цикла, либо в день 1 каждого 4-недельного цикла, в то время как SO-C101 будут продолжать вводить п/к в дозе, установленной на основе примера 9, в день 1 и день 2 (неделя 1), а также день 8 и день 9 (неделя 2), с последующими двумя неделями без введения SO-C101. Режим представлен на Фигуре 15 А (с введением даратумумаба каждый 3-й день каждой недели лечения даратумумабом) и В (с введением даратумумаба каждый 1-й день каждой недели лечения даратумумабом).

В соответствии с данным примером для трех периодов лечения, описанных выше (начальные 8 недель, недели 9-24 и от недели 25 до прогрессирования заболевания), режим введения даратумумаба в сравнении с введением SO-C101 не меняют от одного периода до другого, то есть, во всех периодах даратумумаб либо всегда вводят каждый 3-й день каждой недели, когда его вводят, либо каждый 1-й день каждой недели, когда его вводят.

# 15. Последующее исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при п/к введении яванским макакам

Фармакодинамику RLI-15 тестировали путем оценки профилей иммунных клеток после п/к введения в последующем 10-недельном исследовании на яванских макаках. RLI-

15 (SO-C101) вводили в дозе 40 или 80 мкг/кг один раз в день в 1, 1 и 2, и 1, 2, 3 и 4 последовательных дня каждую неделю (G3, G7 и G8), или в течение 2 недель с недельной паузой (G1, G2 и G5) или с двухнедельной паузой (G4 и G6), всего в течение 10 недель (Фигура 16). Использовали 1 самца и 1 самку на группу. Фармакодинамическую активность в отношении NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали во всех группах в дни -4, 5, 12, 19, 26, 33, 40, 47, 54, 61 и 68. Оценку абсолютного и относительного количества клеток в подгруппах лимфоцитов в периферической крови всех животных проводили методом проточной цитометрии. Абсолютное количество лимфоцитов в подгруппах определяли с использованием процентного содержания клеточных популяций, определенного методом проточной цитометрии, которое пересчитывали в гематологическое количество лейкоцитов, представленное в размерности количества клеток на мкл (Фигура 17а, b). Процентное содержание пролиферирующих Кі67<sup>+</sup> NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии (Фигура 17с, d).

Изучение количества NK-клеток и CD8+ Т-клеток (Фигура 17a, b) показало, что все режимы лечения приводят к увеличению количества NK-клеток. Отдельные дозы были выбраны для наблюдения за возможными различиями между режимами с упором на уровень CD8+ Т-клеток. Поскольку NK-клетки примерно на порядок более чувствительны к стимуляции RLI-15, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки, аналогичное увеличение количеств NK-клеток при всех режимах, таким образом, было ожидаемым. Что касается CD8+ Т-клеток, режимы с применением непрерывной стимуляции один раз в неделю (G7 и G8) привели к наименьшему размножению СD8+ Т-клеток при непрерывном лечении. Например, сравнение равного общего количества RLI-15 за неделю лечения (80 мкг/кг), вводимого в два дня в течение двух недель с недельным перерывом (G1) и непрерывно вводимого в течение 8 недель, либо разделенным на два дня (G3), либо раз в неделю (G8), показывает, что при обоих непрерывных режимах дозирования количество CD8+ Т-клеток уже начинает снижаться во время лечения, в то время как в режиме дозирования с недельным перерывом (то есть, также в целом с меньшим количеством вводимого RLI-15) наблюдается непрерывное увеличение количества CD8+ Т-клеток (Фигура 17a). Этот эффект становится еще более очевидным при взгляде на % Ki-67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-клеток (Фигура 17с), где явно результаты G1 превосходят результаты G8 и G3, несмотря на меньшее общее количество вводимого RLI-15. Все периоды лечения приводят к аналогичной высокой активации CD8+ Т-клеток с высокими пиками, в то время как в случае обоих непрерывных методов лечения % активированных CD8+ Т-клеток начинает снижаться еще во время периода лечения (G8 и G3).

В заключение, перерыв в лечении имеет преимущества, и импульсный циклический режим приводит к циклической высокой степени размножения и активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Кроме того, сравнение G8 и G3 при введении одинаковых количеств RLI-15 показывает, что % Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток значительно выше, если одну и ту же общую дозу разделяют и вводят в течение двух последовательных дней (G3), в сравнении с введением один раз в один день (G1). Соответственно, импульсный режим дозирования

G3 имеет явное преимущество перед непрерывным режимом дозирования G8. Хотя, как описано выше, количества вводимого RLI-15 были выбраны с акцентом на CD8<sup>+</sup> Т-клетки, и находятся на слишком высоком уровне, чтобы увидеть различия в ответах NK-клеток, все еще можно наблюдать, что пролиферация NK-клеток снижается при непрерывном введении RLI-15 (сравните G1 с G8 и G3 на Фигуре 17а и с).

При сравнении G2 и G6, когда одно и то же общее количество RLI-15 либо вводят в два последовательных дня (день 1 и 2, в каждом случае 80 мкг/кг), либо разделяют на 4 последовательных дня (день 1, 2, 3 и 4, в каждом случае 40 мкг/кг), становится очевидным, что продление лечения с 2 до 4 дней (даже за счет уменьшения суточной дозы) приводит к большему увеличению количества CD8<sup>+</sup> T-клеток, в то время как в то же время количества NK-клеток являются более низкими (сравните Фигуру 17b, G2 и G6). Однако, если посмотреть на % активированных CD8<sup>+</sup> T-клеток (Ki-67<sup>+</sup>), 2-дневный режим лечения оказывается более эффективным (Фигура 17d, G2 и G6).

# 16. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при п/к введении яванским макакам в интенсивном режиме дозирования

Для понимания ограничений стимуляции фармакодинамику RLI-15 изучали при более интенсивном дозировании путем оценки профилей иммунных клеток после п/к введения яванским макакам. RLI-15 (SO-C101) вводили 3x 7 мкг/кг/сутки (G2) или 3x 13 мкг/кг/сутки (G3) и сравнивали с дозой 40 мкг/кг, вводимой 1х/сутки в течение 4 последовательных дней/неделю (G1) (Фигура 18). Использовали 1 самца и 1 самку на группу. Фармакодинамическую активность в отношении NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали во всех группах в дни -4, 3, 5, 9 и 16. Оценку абсолютного и относительного количества клеток в подгруппах лимфоцитов в периферической крови всех животных проводили методом проточной цитометрии, а также путем определения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) выбранных маркеров. Абсолютное количество лимфоцитов в подгруппах определяли с использованием процентного содержания клеточных популяций, проточной цитометрии, которое определенного методом пересчитывали гематологическое количество лейкоцитов, представленное в размерности количества клеток на мкл (Фигура 19). Процентное содержание пролиферирующих Ki67<sup>+</sup> NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии (Фигура 19).

Определяли уровни экспрессии IL-2Rβ (CD122), поскольку описано, что IL-2 и IL-15 индуцируют истощение и окончательную дифференциацию при хроническом воздействии вируса (Beltra et al. 2016). Соответственно, высокие уровни экспрессии CD122 можно рассматривать как маркер истощения и окончательной дифференциации. Кроме того, определяли уровни экспрессии CD8, поскольку низкие уровни CD8 коррелируют с низкой чувствительностью к антигенам, и низкая экспрессия CD8 коррелирует с Т-клеточным фенотипом 2 типа (Harland et al. 2014), что снижает Т-клеточную активность и реакцию на антигены.

Протестированный интенсивный/плотный режим дозирования, с суточными дозами, разделенными на 3 введения, приводит к значительно более высоким количествам

NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в сравнении с введением один раз в день в течение 4 последовательных дней (Фигура 19, левые панели). При взгляде на Ki67<sup>+</sup> клетки становится ясно, что, начиная в день 5 в случае NK-клеток, и с дня 5 до дня 9 в случае CD8<sup>+</sup> Т-клеток, количество пролиферирующих клеток начинает снижаться, несмотря на дальнейшую стимуляцию (Фигура 19, средние панели). Поскольку существует задержка между измеряемой пролиферацией и дозированием, которая длиннее для CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем для NK-клеток, стимуляция в течение более чем 4 последовательных дней не приводит к дополнительной пролиферации. Кроме того, было замечено, что после дня 5 экспрессия маркера истощения CD122 на CD8<sup>+</sup> Т-клетках заметно увеличилась, что еще раз говорит о том, что слишком сильное и/или слишком длительное воздействие агониста IL-2/IL-15Rβγ приводит к истощению иммунных эффекторных клеток и не способствует дальнейшему лечению.

С другой стороны, исследование показало, что короткое плотное (то есть, разделение суточных доз на несколько инъекций в течение дня, в данном случае 3 введения в день) импульсное (в течение нескольких последовательных дней, вероятно, до 4 дней) с высокой дозой RLI-15/SO-C101 приводило к очень высокому количеству клеток, как NK-клеток, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также Ki67<sup>+</sup> NK и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как количество маркеров истощения еще не увеличилось. Соответственно, плотное импульсное циклическое дозирование рассматривается как альтернативный перспективный режим, который даже можно объединять с более длительными периодами перерыва в лечении/отдыха в несколько недель.

# 17. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при п/к введении яванским макакам в плотном импульсном циклическом режиме дозирования

Запланировано перенесение интенсивного/плотного импульсного циклического режима дозирования в клинику и тестирование на активность при использовании одного средства, поскольку относительно короткоживущие агонисты IL-2/IL-15Rβγ, такие как RLI-15/SO-C101, хорошо подходят для плотного импульсного режима даже в высокой дозе, поскольку возможно прекращение воздействия в случае проблем с безопасностью. Как показали предыдущие эксперименты, ожидается более сильное размножение NK и CD8<sup>+</sup> T-клеток, чем в случае импульсного циклического режима дозирования, однако такой режим также должен иметь пульсирующий период с 2, 3 или 4 последовательными днями введения, чтобы избежать истощения иммунных клеток.

Соответственно, дальнейшее исследование фармакокинетики и фармакодинамики RLI-15 при п/к введении яванским макакам для тестирования интенсивного/плотного импульсного циклического режима дозирования в настоящее время проходит подготовку по аналогии с тестированием, описанным в примере 16, со следующими группами дозирования, G1-G6 (смотри Фигуру 20):

G1 и G2 представляют собой группы, которые исследуют в течение 12 недель (недели исследования 1-12, H1-H12); G3-G6 представляют собой группы, которые

исследуют в течение 10 недель (Н1-Н10).

Как показано на Фигуре 20, животным в G1 и G2 выполняют введение в течение 3 последовательных дней без дальнейшего лечения до конца 14 дней, повторяют один раз, затем следуют 3 недели перерыва, при этом суточную дозу примерно 40 мкг/кг RLI-15 разделяют на 3 дозы по 13 мкг/кг в G1 и 2 дозы по 20 мкг/кг в G2.

G3 начинают с предварительного лечения из 3 последовательных дней введения без последующего введения до конца недели, затем следуют 2 недели перерыва в лечении, а затем 3 последовательных дня введения без последующего введения до конца недели, повторяют один раз, затем следует 1 неделя перерыва в лечении; суточную дозу 40 мкг/кг разделяют на 2 введения по 20 мкг/кг.

В G4, G5 и G6 выполняют введение в течение 2 последовательных дней, с отсутствием введения до конца недели, повторяют один раз, затем следует неделя перерыва; в G4 суточную дозу примерно 40 мкг/кг RLI-15 разделяют на 3 дозы по 13 мкг/кг, и в G5 суточную дозу 40 мкг/кг RLI-15 разделяют на 2 дозы по 20 мкг/кг; как для G4, так и для G5, введение запланировано в день 1 и 2, с отсутствием введения до конца недели, повторяют один раз, затем следует 1 неделя перерыва в лечении. G6 является идентичной G5 с тем единственным отличием, что начальную суточную дозу 40 мкг/кг RLI-15 (опять-таки разделенную на 2 дозы по 20 мкг/кг) увеличивают после первого цикла (2 введения в последовательные дни в неделю, повторяют один раз, с одной неделей перерыва в лечении) на 50% до суточной дозы 60 мкг/кг RLI-15 (разделенной на 2 дозы по 30 мкг/кг), которую вводят в 2 последовательных дня в неделю, повторяют один раз, с одной неделей перерыва в лечении.

Предполагается, что плотное дозирование, предпочтительно высокой дозой агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , например, RLI-15/SO-C101, с импульсом из 2, 3 или 4 последовательных дней, с последующим периодом отдыха, с продолжением такого цикла в течение нескольких недель, приведет к выраженному размножению и активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в дополнение к NK-клеткам, которые являются более реактивными эффекторными клетками), результатом чего может быть даже более сильная активность такого агониста в качестве единственного средства, как это наблюдалось в случае с IL-2, но не с вариантами IL-2 длительного действия, за счет избегания избыточной стимуляции и истощения эффекторных клеток. Кроме того, в случае проблем с безопасностью, вероятность которых возрастает при высоких дозах агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , с такими осложнениями будет легче справиться, учитывая короткий период полувыведения агонистов по изобретению, так как после остановки введения потребуется лишь короткий период для прекращения действия средства.

#### Литература

Abramson, H. N. (2018). "Monoclonal Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma: An Update." Int J Mol Sci 19(12).

Bacac, M., et al. (2017). "Abstract 1594: Enhancement of the anti-tumor activity of CEA TCB via combination with checkpoint blockade by PD-L1 and interleukin-2 variant

immunocytokine." Cancer Research 77(13 Supplement): 1594.

Bacac, M., et al. (2016). "A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors." Clin Cancer Res 22(13): 3286-3297.

Beltra, J. C., et al. (2016). "IL2Rbeta-dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A 113(37): E5444-5453.

Bentebibel, S. E., et al. (2017). The Novel IL-2 Cytokine Immune Agonist NKTR-214 Harnesses the Adaptive and Innate Immune System for the Treatment of Solid Cancers. Society for Immunotherapy of Cancer 2017 Annual Meeting. National Harbor, MD.

Bergamaschi, C., et al. (2018). "Optimized administration of hetIL-15 expands lymphocytes and minimizes toxicity in rhesus macaques." Cytokine 108: 213-224.

Bernett, M. J., et al. (2017). "IL15/IL15Rα heterodimeric Fc-fusions with extended half-lives." Proceedings of the American Association for Cancer Research 58: 408.

Caffaro, C. E., et al. (2019). Discovery of pharmacologically differentiated Interleukin 15 (IL-15) agonists employing a synthetic biology platform. SITC 2019. National Harbor, Maryland.

Castro, I., et al. (2011). "The basis of distinctive IL-2- and IL-15-dependent signaling: weak CD122-dependent signaling favors CD8+ T central-memory cell survival but not T effector-memory cell development." J Immunol 187(10): 5170-5182.

CDER (2005). Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

Charych, D., et al. (2017). "Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR-214, a kinetically-controlled interleukin-2 (IL2) receptor agonist for cancer immunotherapy." PLoS One 12(7): e0179431.

Charych, D., et al. (2013). "Abstract 482: Tipping the balance in the tumor microenvironment: An engineered cytokine (NKTR-214) with altered IL2 receptor binding selectivity and improved efficacy." Cancer Research 73(8 Supplement): 482.

Charych, D. H., et al. (2016). "NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models." Clinical Cancer Research 22(3): 680.

Chenoweth, M. J., et al. (2012). "IL-15 can signal via IL-15Ralpha, JNK, and NF-kappaB to drive RANTES production by myeloid cells." J Immunol 188(9): 4149-4157.

Conlon, K., et al. (2019). Phase I/Ib study of NIZ985 with and without spartalizumab (PDR001) in patients with metastatic/unresectable solid tumors. AACR Annual Meeting, Atlanta, GA.

Conlon, K. C., et al. (2015). "Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer." J Clin Oncol 33(1): 74-82.

- Conlon, K. C., et al. (2019). "Cytokines in the Treatment of Cancer." J Interferon Cytokine Res 39(1): 6-21.
- Darvin, P., et al. (2018). "Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers." Exp Mol Med 50(12): 165.
- De Sousa Linhares, A., et al. (2018). "Not All Immune Checkpoints Are Created Equal." Frontiers in Immunology 9(1909).
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res 32(5): 1792-1797.
- Elpek, K. G., et al. (2010). "Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15Ralpha complexes." Proc Natl Acad Sci U S A 107(50): 21647-21652.
- Felices, M., et al. (2018). "Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect." JCI Insight 3(3).
- Frutoso, M., et al. (2018). "Emergence of NK Cell Hyporesponsiveness after Two IL-15 Stimulation Cycles." J Immunol 201(2): 493-506.
- Fyfe, G., et al. (1995). "Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy." J Clin Oncol 13(3): 688-696.
- Gajewski, T. F., et al. (2013). "Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment." Curr Opin Immunol 25(2): 268-276.
- Gearing, A. J. and R. Thorpe (1988). "The international standard for human interleukin-2. Calibration by international collaborative study." J Immunol Methods 114(1-2): 3-9.
- Ghasemi, R., et al. (2016). "Selective targeting of IL-2 to NKG2D bearing cells for improved immunotherapy." Nat Commun 7: 12878.
- Giron-Michel, J., et al. (2005). "Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15Ralpha complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors." Blood 106(7): 2302-2310.
- Goujon, M., et al. (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res 38(Web Server issue): W695-699.
- Han, K. P., et al. (2011). "IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization." Cytokine 56(3): 804-810.
- Harland, K. L., et al. (2014). "Epigenetic plasticity of Cd8a locus during CD8(+) T-cell development and effector differentiation and reprogramming." Nat Commun 5: 3547.
- Heaton, K. M., et al. (1993). "Human interleukin 2 analogues that preferentially bind the intermediate-affinity interleukin 2 receptor lead to reduced secondary cytokine secretion: implications for the use of these interleukin 2 analogues in cancer immunotherapy." Cancer Res 53(11): 2597-2602.
- Hori, T., et al. (1987). "Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell

leukemia/lymphoma virus." Blood 70(4): 1069-1072.

Hu, P., et al. (2003). "Generation of low-toxicity interleukin-2 fusion proteins devoid of vasopermeability activity." Blood 101(12): 4853-4861.

Joseph, I. B., et al. (2019). "THOR-707, a novel not-alpha IL-2, elicits durable pharmacodynamic responses in non-human primates and efficacy as single agent and in combination with anti PD-1 in multiple syngeneic mouse models. ." Proceedings of the American Association for Cancer Research 60: 838.

Klein, C. (2014). "S41. Novel CEA-targeted IL2 variant immunocytokine for immunotherapy of cancer." Journal for Immunotherapy of Cancer 2(Suppl 2): I8-I8.

Klein, C., et al. (2013). "Abstract PR8: Novel tumor-targeted, engineered IL-2 variant (IL-2v)-based immunocytokines for immunotherapy of cancer." Cancer Research 73(1 Supplement): PR8.

Klein, C., et al. (2017). "Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines." Oncoimmunology 6(3): e1277306.

Kurowska, M., et al. (2002). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2." J Immunol 169(4): 1760-1767.

Larsen, S. K., et al. (2014). "NK cells in the tumor microenvironment." Crit Rev Oncog 19(1-2): 91-105.

Lazear, E., et al. (2017). "Targeting of IL-2 to cytotoxic lymphocytes as an improved method of cytokine-driven immunotherapy." Oncoimmunology 6(2): e1265721.

Liu, B., et al. (2018). "Evaluation of the biological activities of the IL-15 superagonist complex, ALT-803, following intravenous versus subcutaneous administration in murine models." Cytokine 107: 105-112.

Margolin, K., et al. (2018). "Phase I Trial of ALT-803, a Novel Recombinant Interleukin-15 Complex, in Patients with Advanced Solid Tumors." Clin Cancer Res 24(22): 5552-5561.

Miller, J. S., et al. (2018). "A First-in-Human Phase I Study of Subcutaneous Outpatient Recombinant Human IL15 (rhIL15) in Adults with Advanced Solid Tumors." Clin Cancer Res 24(7): 1525-1535.

Miyazaki, T., et al. (2018). "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of NKTR-255, a Polymer-Conjugated Human IL-15, in Cynomolgus Monkey." Blood 132(Suppl 1): 2952-2952.

Needleman, S. B. and C. D. Wunsch (1970). "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." J Mol Biol 48(3): 443-453.

Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." Proc Natl Acad Sci U S A 85(8): 2444-2448.

Perdreau, Hhttps://www.youtube.com/watch?v=sFQkvTsBuoo., et al. (2010). "Different

dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation." Eur Cytokine Netw 21(4): 297-307.

Rhode, P. R., et al. (2016). "Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models." Cancer Immunol Res 4(1): 49-60.

Ring, A. M., et al. (2012).

"Mechanhttps://www.youtube.com/watch?v=sFQkvTsBuooistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15." Nat Immunol 13(12): 1187-1195.

Robinson, T. O. and K. S. Schluns (2017). "The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies." Immunol Lett 190: 159-168.

Romee, R., et al. (2018). "First-in-human Phase 1 Clinical Study of the IL-15 Superagonist Complex ALT-803 to Treat Relapse after Transplantation." Blood 131(23): 2515-2527.

Rosenzwajg, M., et al. (2019). "Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial." Ann Rheum Dis 78(2): 209-217.

Shanafelt, A. B., et al. (2000). "A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo." Nat Biotechnol 18(11): 1197-1202.

Silva, D.-A., et al. (2019). "De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15." Nature 565(7738): 186-191.

Smith, T. F. and M. S. Waterman (1981). "Comparison of biosequences." Advances in Applied Mathematics 2(4): 482-489.

Solomon, B. L. and I. Garrido-Laguna (2018). "TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside." Cancer Immunol Immunother 67(11): 1659-1667.

Soman, G., et al. (2009). "MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of interleukin-15: assay qualification, standardization and statistical analysis." J Immunol Methods 348(1-2): 83-94.

Steel, J. C., et al. (2012). "Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer." Trends Pharmacol Sci 33(1): 35-41.

Thaysen-Andersen, M., et al. (2016). "Recombinant human heterodimeric IL-15 complex displays extensive and reproducible N- and O-linked glycosylation." Glycoconj J 33(3): 417-433.

Toutain, P. L. and A. Bousquet-Melou (2004). "Plasma terminal half-life." J Vet Pharmacol Ther 27(6): 427-439.

Wadhwa, M., et al. (2013). "The 2nd International standard for Interleukin-2 (IL-2) Report of a collaborative study." Journal of Immunological Methods 397(1): 1-7.

Waldmann, T. A. (2015). "The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy." Cancer Immunol Res 3(3): 219-227.

Wei, X., et al. (2001). "The Sushi domain of soluble IL-15 receptor alpha is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo." J

Immunol 167(1): 277-282.

Wrangle, J. M., et al. (2018). "ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial." Lancet Oncol 19(5): 694-704.

WO 2005/085282A1

WO 2007/046006A2

WO 2008/003473A2

WO 2008/143794A1

WO 2009/135031A1

WO 2012/065086A1

WO 2012/107417A1

WO 2012/175222A1

WO 2014/066527A2

WO 2014/145806A2

WO 2014/207173A1

WO 2015/018528A1

WO 2015/109124A2

WO 2016/060996A2

WO 2016/142314A1

WO 2017/046200A1

WO 2017/112528A2

WO 2018/071918A1

WO 2018/071919A1

WO 2018/102536A1

WO 2018/151868A2

WO 2018/213341A1

WO 2019/028419A1

WO 2019/028425A1

WO 2019/165453A1

WO 2019/173798A1

US 2003/0124678

US 2006/0057680

US 2007/0036752

US 2017/0088597

US 2018/0118805

US 2019/0092830

US 5229109

US 10206980

NCT02983045 at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018

NCT03386721 at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018

NCT02627284 at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018 NCT03063762 at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018 NCT03388632, at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018 NCT01572493, at www.clinicaltrials.gov, as of 16.08.2018 NCT01021059, at www.clinicaltrials.gov, as of 14.05.2019

#### Варианты осуществления изобретения

- 1. Агонист рецептора  $\beta\gamma$  интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ ) для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:
- (а) первый период из x дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение y последовательных дней в начале первого периода, затем в течение x-y дней агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  не вводят,

где х составляет 5, 6, 7, 8 или 9 дней, и у составляет 2, 3 или 4 дня;

- (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и
- (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней.
- 2. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по варианту осуществления 1, где x составляет 6, 7 или 8 дней, предпочтительно 7 дней.
- 3. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по вариантам осуществления 1 или 2, где у составляет 2 или 3 дня, предпочтительно 2 дня.
- 4. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-3, где z составляет 7 дней.
- 5. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-4, где х составляет 7 дней, у составляет 2 дня и z составляет 7 дней.
- 6. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-5, где суточная доза составляет 0,1-50 мкг/кг, предпочтительно 0,25-25 мкг/кг, более предпочтительно 0,6-10 мкг/кг и, в частности, 2-10 мкг/кг.
- 7. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-6, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б), предпочтительно п/к.
- 8. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-7, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (а) приводит к увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (b) приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (а).
- 9. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-8, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  приводит к поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в

сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15Rβγ, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.

- 10. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-9, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  приводит к количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере 1,1×10<sup>3</sup> NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.
- 11. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из вариантов осуществления 1-10, где циклическое введение повторяют в течение по меньшей мере 3 циклов, предпочтительно 5 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 10 циклов, и даже более предпочтительно до прогрессирования заболевания.
- 12. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-11, где суточную дозу, выбранную из диапазона доз 0,1-50 мкг/кг, практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, где дозу поддерживают на протяжении режима введения.
- 13. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из вариантов осуществления 1-12, где рак представляет собой гематологический рак или солидный рак.
- 14. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-13, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч.
- 15. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-14, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  является по меньшей мере на 70% мономерным, предпочтительно по меньшей мере на 80% мономерным.
- 16. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-15, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  представляет собой комплекс интерлейкина-15 (IL-15)/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ).
- 17. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по варианту осуществления 16, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  представляет собой слитый белок, содержащий sushi домен IL-15R $\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15R $\alpha$  человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4.
- 18. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-17, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  имеет последовательность SEQ ID NO: 9.
- 19. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 1-18, где ингибитор контрольных точек вводят в начале первого периода (а) каждого цикла.
- 20. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по варианту осуществления 19, где ингибитор контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-LAG-3 антитело, анти-TIM-3 антитело или анти-

- CTLA4 антитело, предпочтительно анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело.
- 21. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15Rβγ в соответствии со следующим режимом введения, включающим
- (i) введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку в суточной дозе в течение первого количества последовательных дней; и
  - (ii) второе количество дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,
- где первое количество составляет 2, 3 или 4 дня, и второе количество составляет 3, 4 или 5 дней.
- 22. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по варианту осуществления 21, где режим введения повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере два раза, более предпочтительно по меньшей мере 4 раза, наиболее предпочтительно до прогрессирования заболевания.
- 23. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по варианту осуществления 21, где первый период составляет 2 дня, и второй период составляет 5 дней.
- 24. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по вариантам осуществления 21 или 23, где суточная доза составляет 0,1-50 мкг/кг.
- 25. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из вариантов осуществления 21-24, где дозу 0,1-50 мкг/кг практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, где дозу поддерживают на протяжении режима введения.
- 26. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-25, где доза составляет 1-30 мкг/кг, предпочтительно 2-20 мкг/кг и наиболее предпочтительно 2-10 мкг/кг агониста IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$ .
- 27. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-26, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б), предпочтительно п/к.
- 28. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 22-27, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (i) приводит к увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  после первого повторения приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (i).
- 29. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 22-28, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  приводит к поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , после по меньшей мере одного повторения периода (i), предпочтительно после по меньшей мере двух повторений периода (i).
- 30. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 22-29, где введение агониста IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  приводит к количеству NK-клеток,

составляющему по меньшей мере  $1,1\times10^3$  NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения периода (i), предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.

- 31. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из вариантов осуществления 21-30, где рак представляет собой гематологический рак или солидный рак.
- 32. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-31, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч.
- 33. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из вариантов осуществления 21-32, где агонист IL-2/IL-15Rβγ является по меньшей мере на 70% мономерным.
- 34. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-33, где агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  представляет собой комплекс IL-15/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15 $R\alpha$ ).
- 35. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-34, где комплекс IL-15/IL-15 $R\alpha$  представляет собой слитый белок, содержащий sushi домен IL-15 $R\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15 $R\alpha$  человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4.
- 36. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из вариантов осуществления 21-35, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  имеет последовательность SEQ ID NO: 9.
- 37. Набор, включающий агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  по любому из вариантов осуществления 1-36, инструкцию по применению агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  в циклическом режиме введения по любому из вариантов осуществления 1-20 или в режиме введения по любому из вариантов осуществления 21-36 и, необязательно, устройство для введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .
- 38. Набор по варианту осуществления 37, дополнительно включающий ингибитор контрольных точек и инструкцию по применению ингибитора контрольных точек.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Агонист рецептора βγ интерлейкина-2/интерлейкина-15 (IL-2/IL-15Rβγ) для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15Rβγ пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:
- (а) первый период из х дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение у последовательных дней в начале первого периода, затем в течение x-у дней агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  не вводят,

где х составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день, предпочтительно, 7 или 14 дней, и

у составляет 2, 3 или 4 дня, предпочтительно 2 или 3 дня;

- (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и
- (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,

где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 или 70 дней, предпочтительно 7, 14, 21 или 56 дней, более предпочтительно 7 дней или 21 день.

- 2. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 1, включающего введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку с использованием циклического режима введения, где циклический режим введения включает:
- (а) первый период из x дней, в течение которого агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  вводят в суточной дозе в течение y последовательных дней в начале первого периода, затем в течение x-y дней агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  не вводят,

где х составляет 5, 6, 7, 8 или 9 дней, предпочтительно, 6, 7 или 8 дней, более предпочтительно 7 дней, и

у составляет 2, 3 или 4 дня, предпочтительно 2 или 3 дня, более предпочтительно 2 дня;

- (b) повторение первого периода по меньшей мере один раз; и
- (c) второй период из z дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,

где z составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней, предпочтительно 7 или 14 дней, более предпочтительно 7 дней.

- 3. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1 или 2, где х составляет 7 дней, у составляет 2, 3 или 4 дня и z составляет 7 дней, предпочтительно, где у составляет 2 дня и z составляет 7 дней.
- 4. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-3, где суточная доза составляет от 0,1 мкг/кг до 50 мкг/кг, предпочтительно от 0,25 мкг/кг до 25 мкг/кг, более предпочтительно от 0,6 мкг/кг до 10 мкг/кг и даже более предпочтительно от 2 мкг/кг до 10 мкг/кг.
- 5. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 4, где суточная доза составляет от 3 мкг/кг до 20 мкг/кг, предпочтительно 6-12 мкг/кг.
  - 6. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по п. 4 или 5, где суточную дозу,

выбранную из диапазона доз 0,1-50 мкг/кг, практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, где дозу поддерживают на протяжении режима введения.

- 7. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-3, где суточная доза представляет собой фиксированную дозу, независимую от массы тела, составляющую от 7 мкг до 3500 мкг, предпочтительно от 17,5 мкг до 1750 мкг, более предпочтительно от 42 мкг до 700 мкг и, в частности, от 140 мкг до 700 мкг.
- 8. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-5 или 7, где суточную дозу увеличивают на протяжении режима введения.
- 9. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 8, где суточную дозу увеличивают после каждого периода из х дней.
- 10. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из п. 8 или п. 9, где суточную дозу увеличивают на 20% 100%, предпочтительно на 30% 50% после каждого периода из х дней.
- 11. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по п. 8, где суточную дозу увеличивают один раз после первого периода из x дней.
- 12. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 11, где суточную дозу увеличивают на 20% 100%, предпочтительно на 30% 50% после первого периода из х дней.
- 13. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-12, где суточную дозу вводят одной инъекцией.
- 14. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-12, где суточную дозу разделяют на 2 или 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 4 ч, и предпочтительно не более 14 ч.
- 15. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по п. 14, где суточную дозу разделяют на 3 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 5 ч до примерно 7 ч, предпочтительно примерно 6 ч.
- 16. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по п. 14, где суточную дозу разделяют на 2 отдельные дозы, которые вводят в течение одного дня, при этом временной интервал между введением отдельных доз составляет от примерно 6 ч до примерно 10 ч, предпочтительно примерно 8 ч.
- 17. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-16, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят подкожно (п/к) или внутрибрющинно (в/б), предпочтительно п/к.
- 18. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-17, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (а) приводит к
- (1) увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (b) приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70%

от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (а), или

- (2) поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода, и/или
- (3) количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере  $1,1\times10^3$  NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения первого периода, предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.
- 19. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по любому из пунктов 1-18, где циклическое введение повторяют в течение по меньшей мере 3 циклов, предпочтительно 5 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 10 циклов, и даже более предпочтительно до прогрессирования заболевания.
- 20. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-19, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч.
- 21. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-20, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  представляет собой комплекс интерлейкина-15 (IL-15)/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ), предпочтительно слитый белок, содержащий sushi домен IL-15R $\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15R $\alpha$  человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4,

более предпочтительно, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  имеет последовательность SEQ ID NO: 9.

- 22. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 1-21, где дополнительное лекарственное средство вводят в сочетании с агонистом IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .
- 23. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 22, где дополнительное лекарственное средство и агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят в одни и те же дни и/или в разные дни.
- 24. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 22 или п. 23, где введение дополнительного лекарственного средства выполняют в соответствии с режимом введения, который не зависит от режима введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .
- 25. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 22-24, где дополнительное лекарственное средство выбрано из ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела.
- 26. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по п. 25, где ингибитор контрольных точек или терапевтическое антитело вводят в начале первого периода (а) каждого цикла.
- 27. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 25-26, где х дней и z дней адаптируют к тому, чтобы

целочисленное кратное значение х дней+z дней равнялось количеству дней одного цикла лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом, или

если цикл лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом меняется с течением времени, равнялось количеству дней каждого отдельного цикла лечения ингибитором контрольных точек или терапевтическим антителом.

- 28. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 25-27, где ингибитор контрольных точек выбран из анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-TIM-3 антитела, анти-CTLA4 антитела или анти-TIGIT антитела, предпочтительно представляет собой анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело.
- 29. Агонист IL-2/IL-15 $R\beta\gamma$  для применения по п. 25, где терапевтическое антитело выбрано из анти-CD38 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD79B антитела, анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR2 антитела, анти-GD2 антитела, антитела против нектина 4 и анти-Trop-2 антитела, предпочтительно представляет собой анти-CD38 антитело.
- 30. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по п. 29, где в недели с введением анти-CD38 антитела анти-CD38 антитело вводят в 1-й день или в 3-й день недели.
- 31. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения в лечении, или облегчении, рака или инфекционных заболеваний, включающего введение агониста IL-2/IL-15Rβγ в соответствии со следующим режимом введения, включающим
- (i) введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  пациенту-человеку в суточной дозе в течение первого количества последовательных дней; и
  - (ii) второе количество дней без введения агониста IL-2/IL-15Rβγ,

где первое количество составляет 2, 3 или 4 дня, и второе количество составляет 3, 4 или 5 дней, при этом первое количество и второе количество в сумме составляют 7 дней, предпочтительно, где первое количество составляет 2 дня и второе количество составляет 5 дней,

где режим введения повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере два раза, более предпочтительно по меньшей мере 4 раза, наиболее предпочтительно до прогрессирования заболевания.

- 32. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 31, где суточная доза составляет 0,1-50 мкг/кг, предпочтительно, где дозу 0,1-50 мкг/кг практически не увеличивают на протяжении режима введения, предпочтительно, где дозу поддерживают на протяжении режима введения.
- 33. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 31-32, где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  на этапе (i) приводит к
- (1) увеличению % Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток от общего количества NK-клеток в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , и где введение агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  после первого повторения приводит к уровню Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток, который составляет по меньшей мере 70% от уровня Ki-67<sup>+</sup> NK-клеток на этапе (i),
  - (2) поддержанию количества NK-клеток или, предпочтительно, к увеличению

количества NK-клеток до по меньшей мере 110%, в сравнении с отсутствием введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , после по меньшей мере одного повторения периода (i), предпочтительно после по меньшей мере двух повторений периода (i), и/или

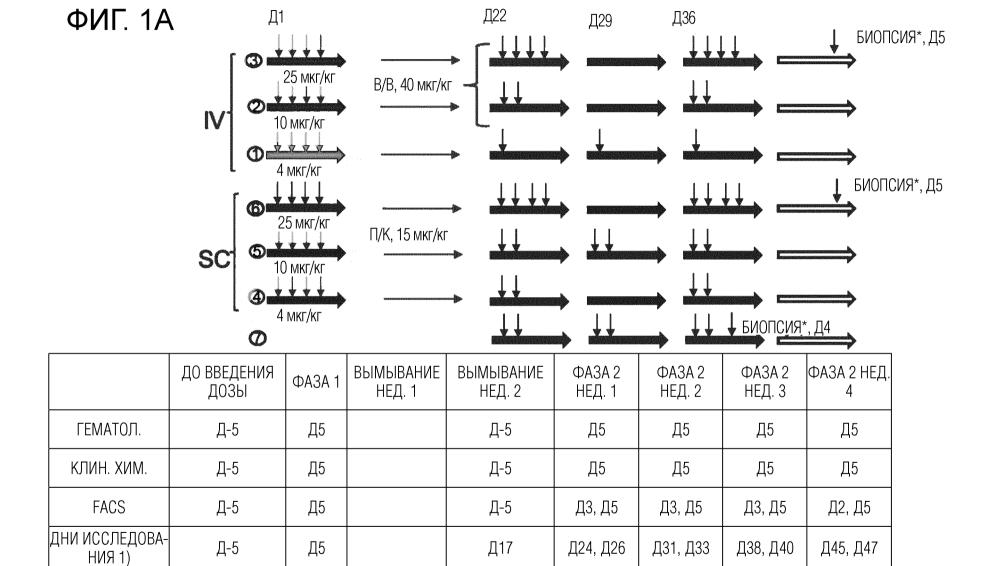
- (3) количеству NK-клеток, составляющему по меньшей мере  $1.1 \times 10^3$  NK-клеток/мкл, после по меньшей мере одного повторения периода (i), предпочтительно после по меньшей мере двух повторений первого периода.
- 34. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 31-33, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  имеет период полувыведения in vivo, составляющий от 30 мин до 24 ч, предпочтительно от 1 ч до 12 ч, более предпочтительно от 2 ч до 6 ч.
- 35. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 31-34, где агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  представляет собой комплекс IL-15/рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ),

предпочтительно, где комплекс IL-15/IL-15R $\alpha$  представляет собой слитый белок, содержащий sushi домен IL-15R $\alpha$  человека или его производное, гибкий линкер и IL-15 человека или его производное, предпочтительно, где sushi домен IL-15R $\alpha$  человека содержит последовательность SEQ ID NO: 6, и где IL-15 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 4,

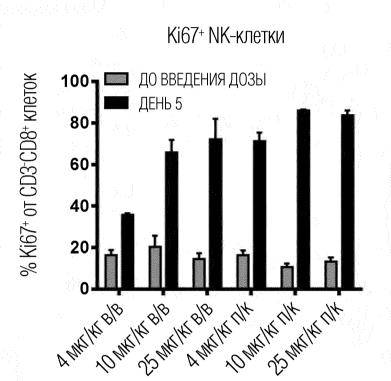
более предпочтительно, где комплекс IL-15/IL-15 $R\alpha$  комплекс имеет последовательность SEQ ID NO: 9.

- 36. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 31-35, где дополнительное лекарственное средство вводят в сочетании с агонистом IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .
- 37. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 36, где дополнительное лекарственное средство и агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  вводят в одни и те же дни и/или в разные дни.
- 38. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 36 или п. 37, где введение дополнительного лекарственного средства выполняют в соответствии с режимом введения, который не зависит от режима введения агониста IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .
- 39. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по любому из пунктов 36-38, где дополнительное лекарственное средство выбрано из ингибитора контрольных точек или терапевтического антитела.
- 40. Агонист IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  для применения по п. 39, где ингибитор контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-LAG-3 антитело, анти-TIM-3 антитело, анти-CTLA4 антитело или анти-TIGIT антитело, предпочтительно анти-PD-L1 антитело или анти-PD-1 антитело.
- 41. Агонист IL-2/IL-15Rβγ для применения по п. 39, где терапевтическое антитело выбрано из анти-CD38 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD79B антитела, анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR2 антитела, анти-GD2 антитела, анти-CD38 антитела против нектина 4 и анти-Trop-2 антитела, предпочтительно представляет собой анти-CD38 антитело.

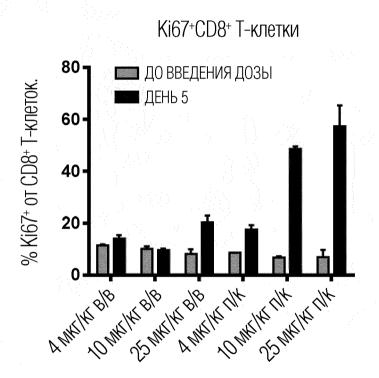
По доверенности



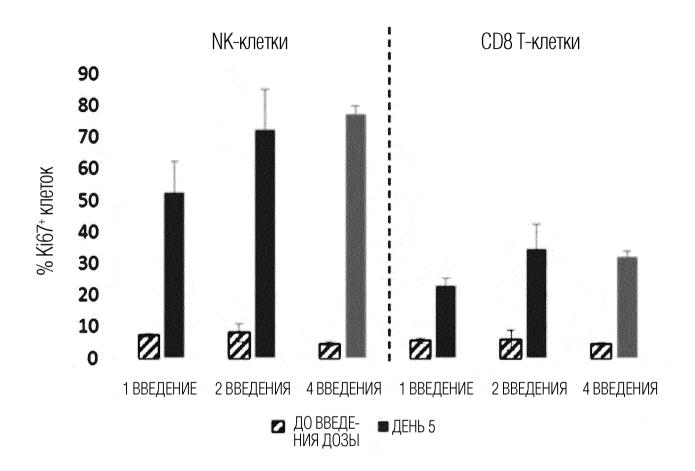
ФИГ. 1В



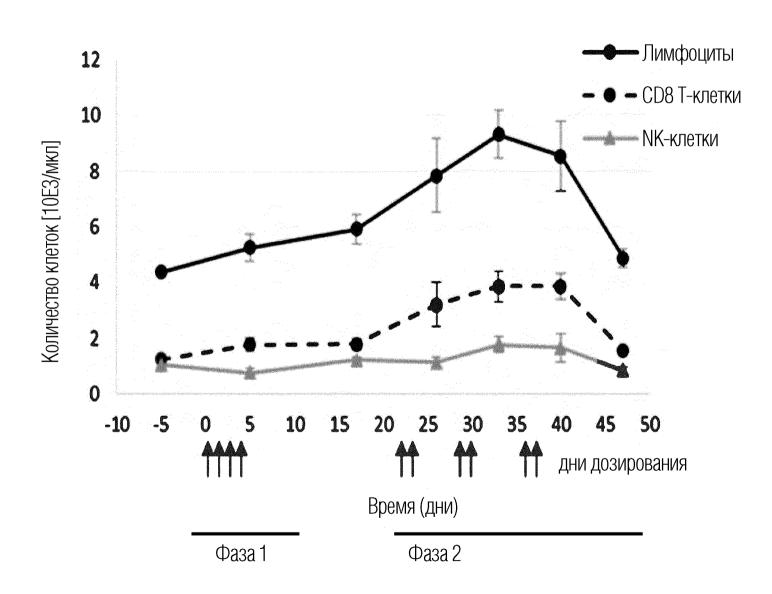
ФИГ. 1С

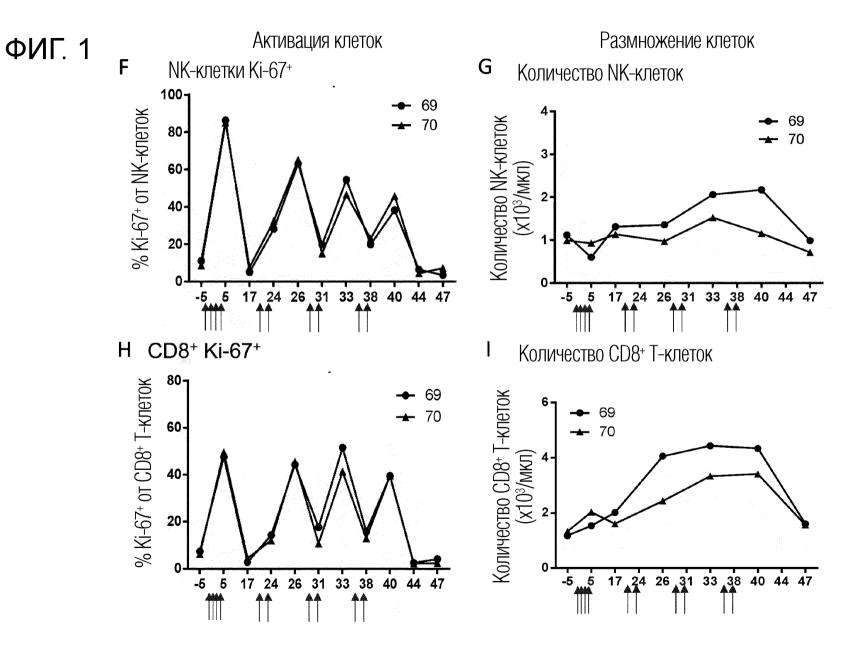


# ФИГ. 1D

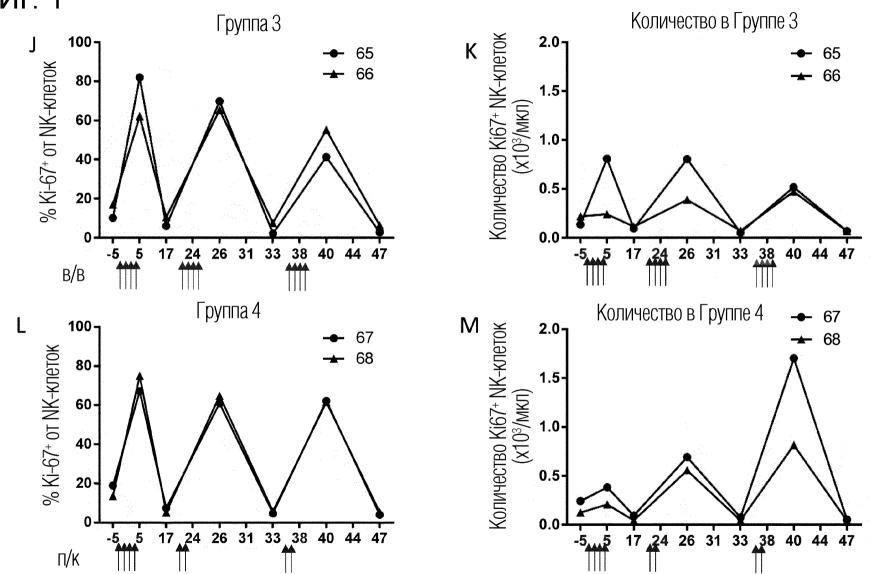


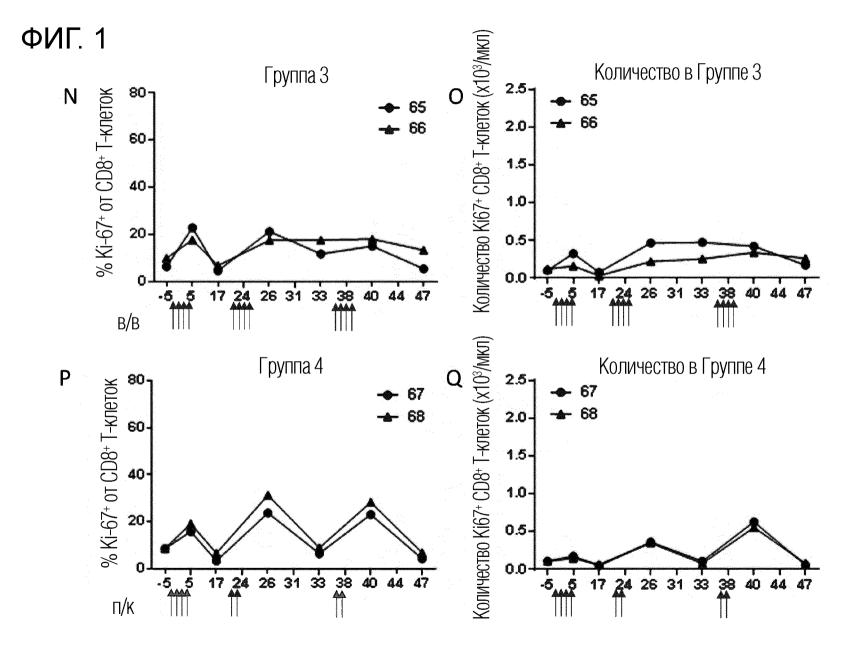
# ФИГ. 1Е

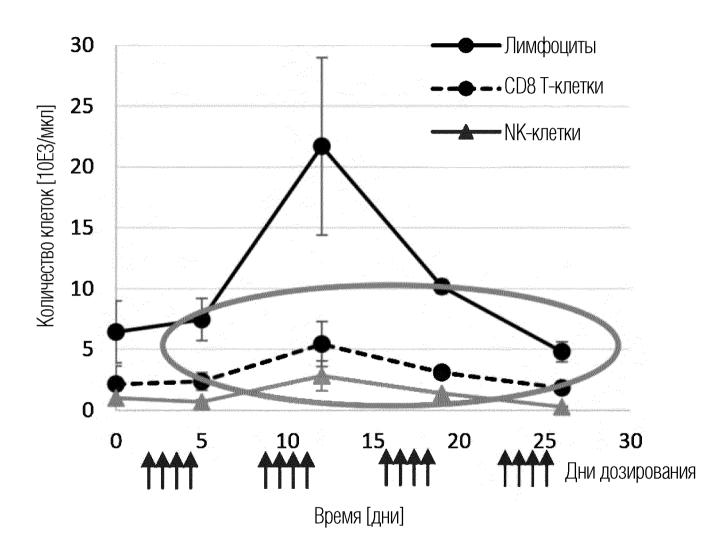




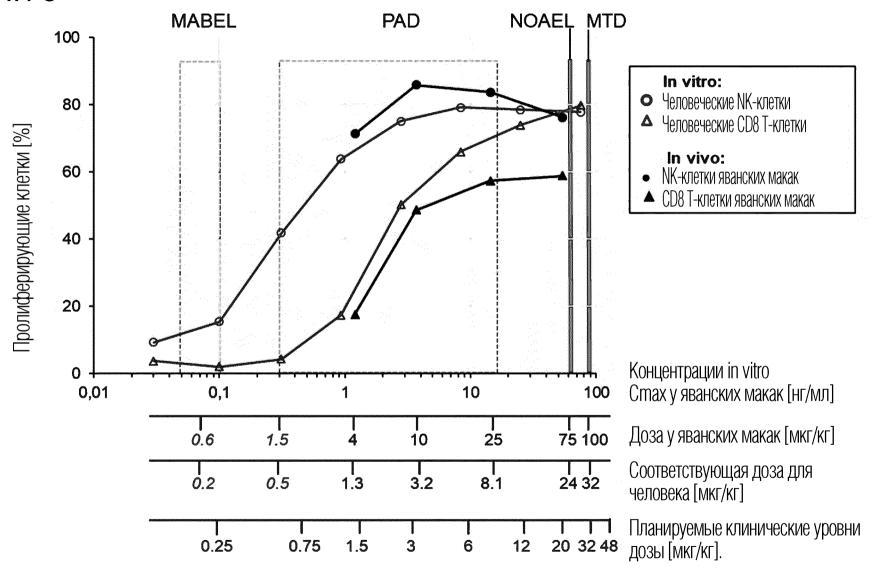




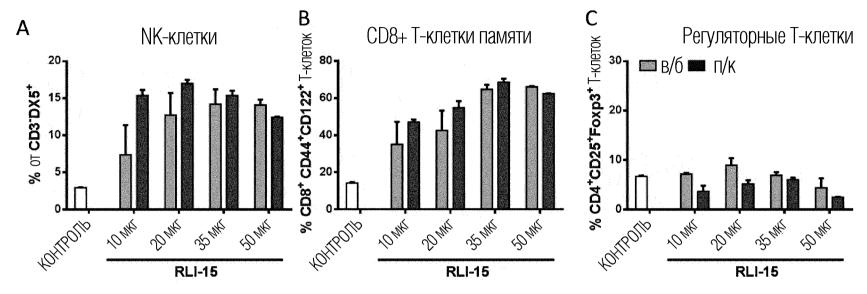


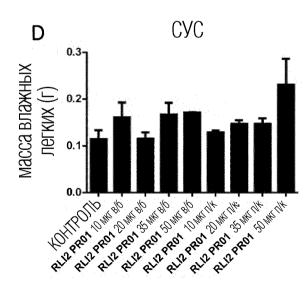


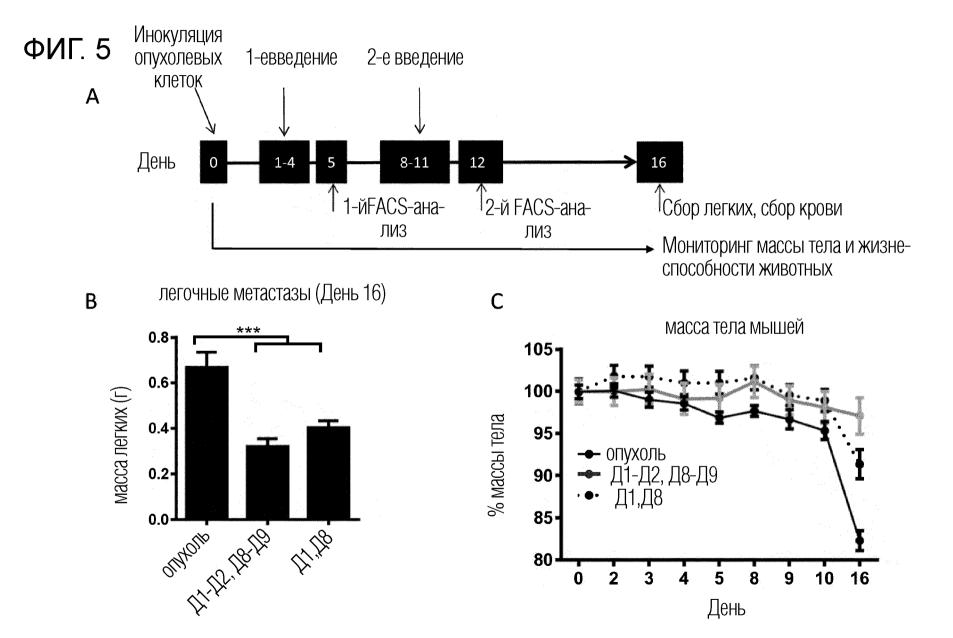
ФИГ. 3

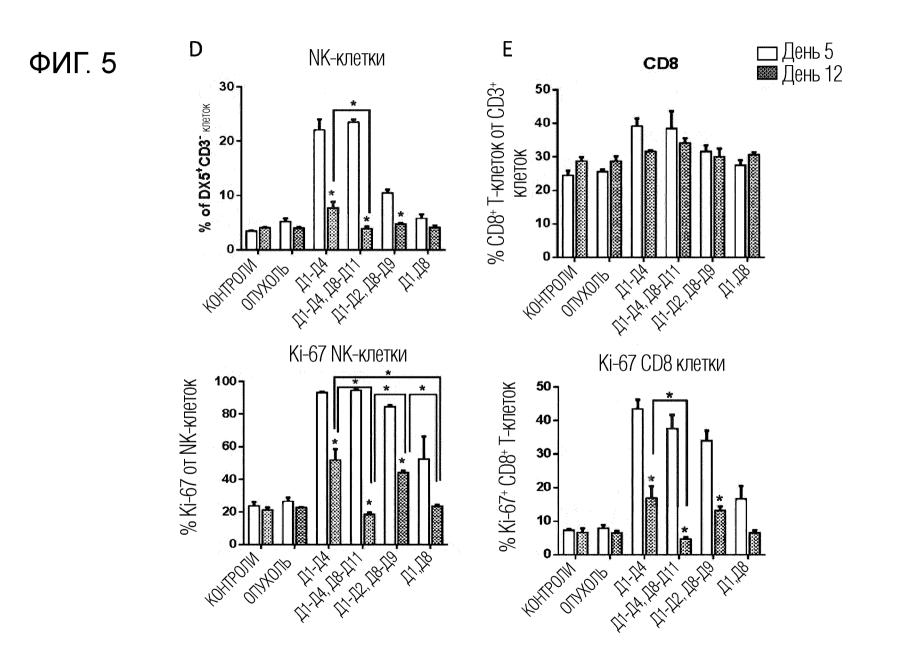


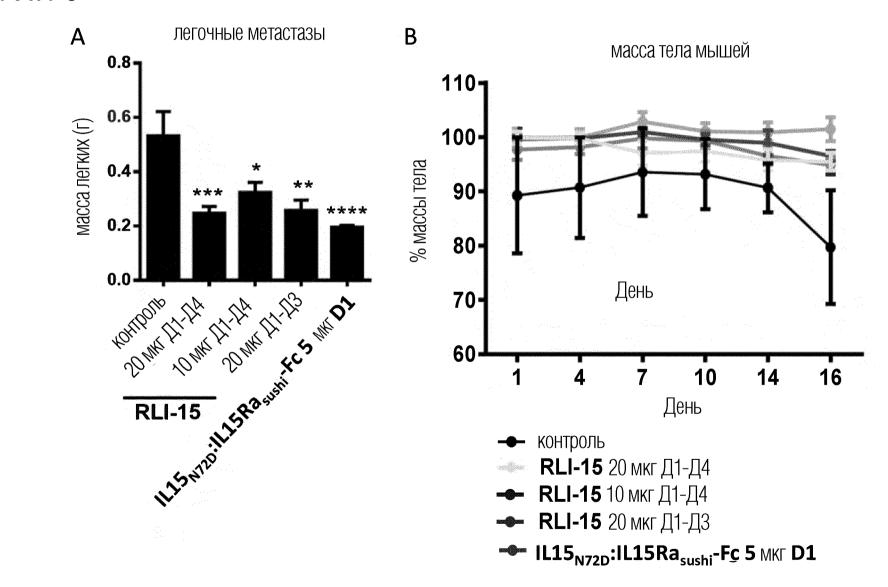




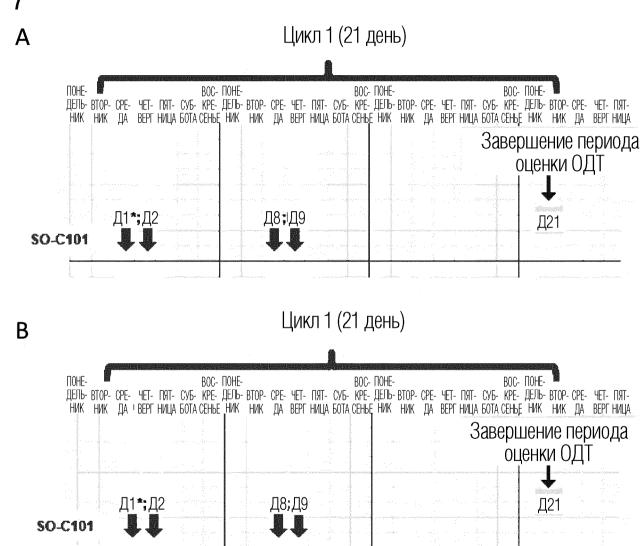


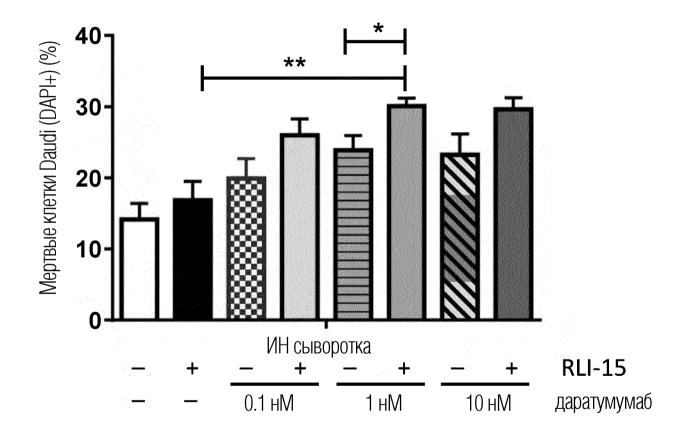


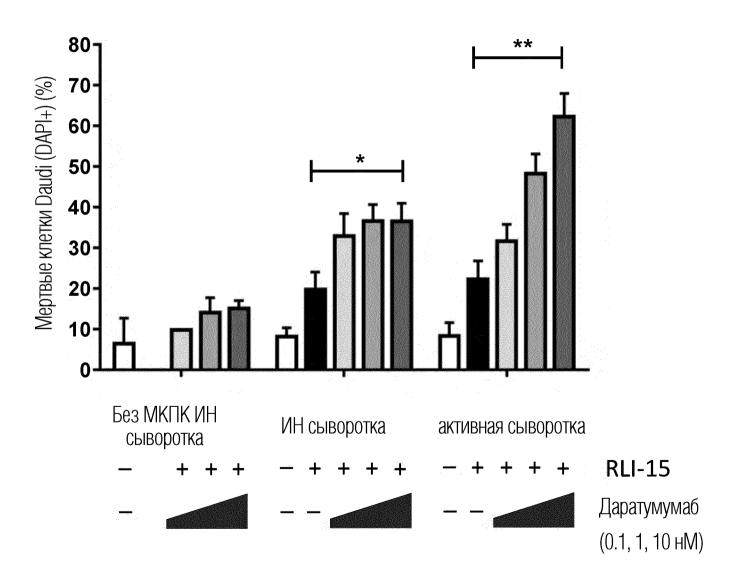


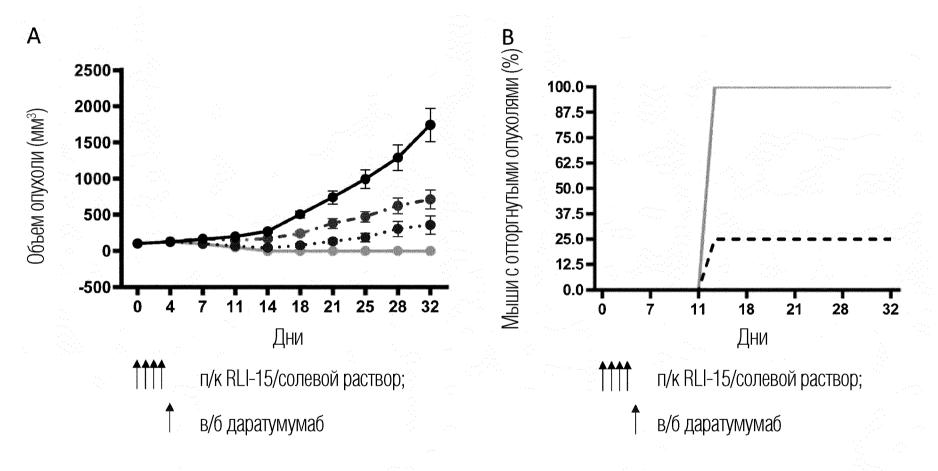


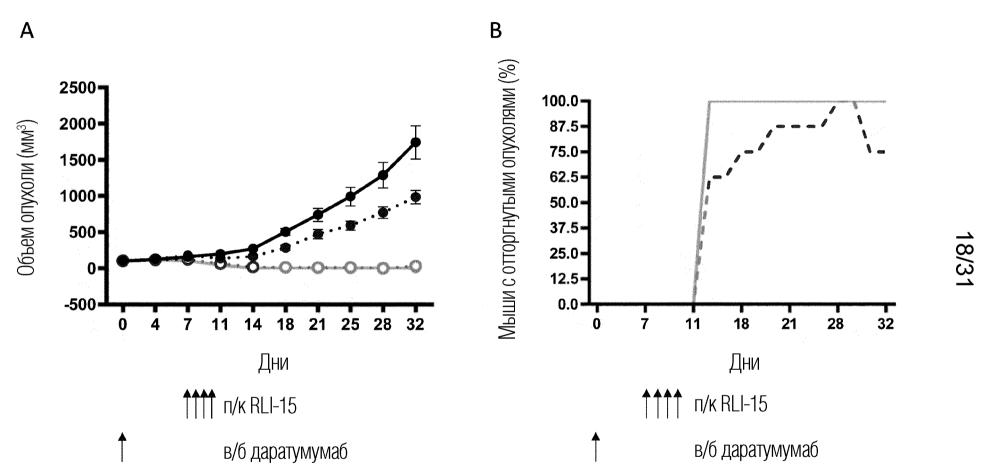
пембролизумаб

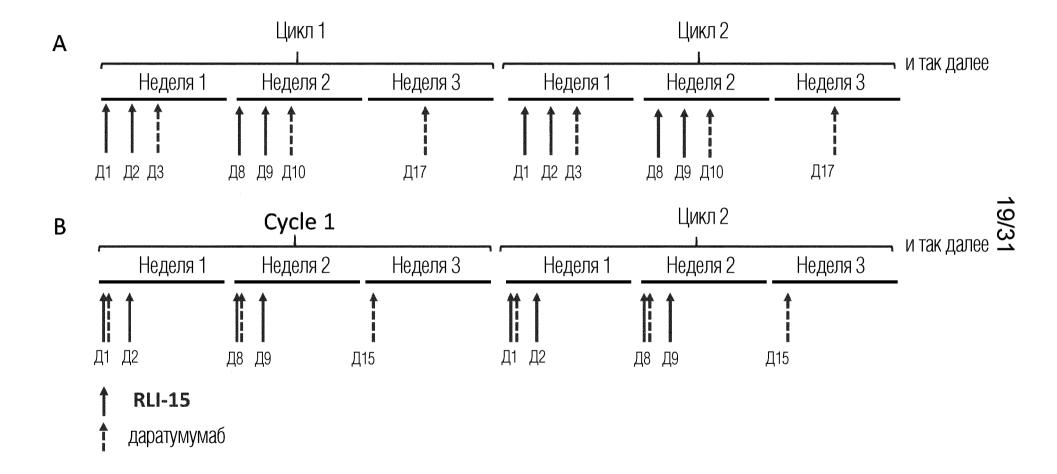


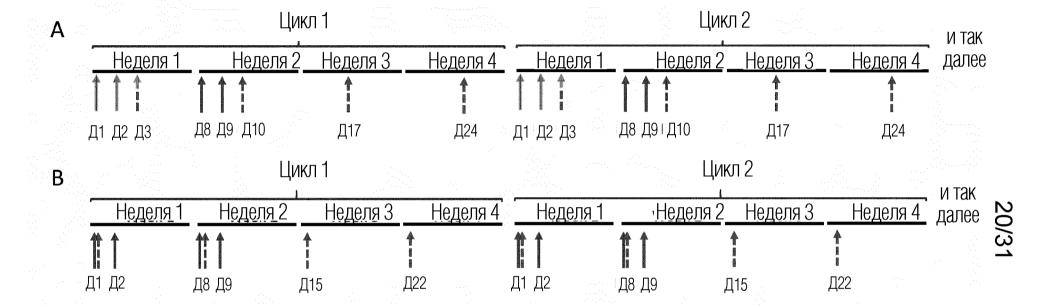




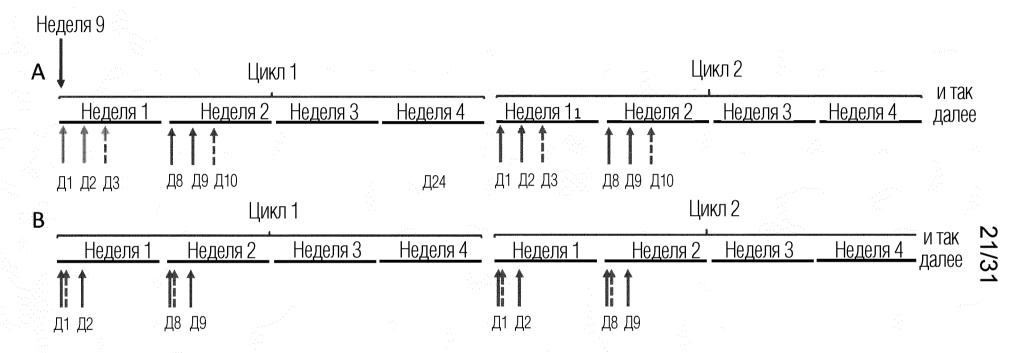






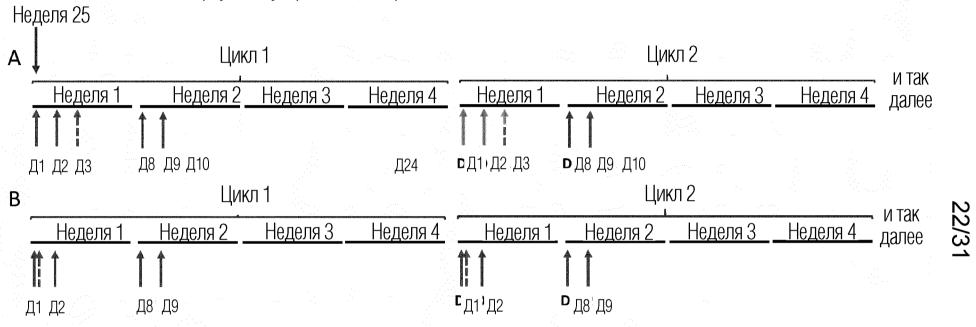


**↑ RLI-15** даратумумаб



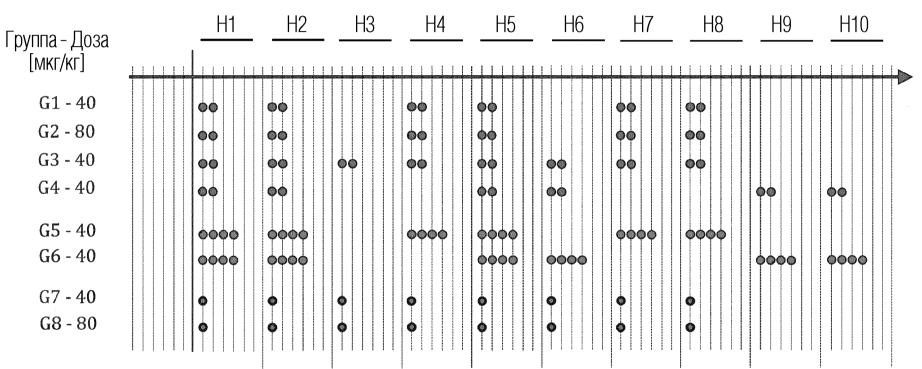


ФИГ. 15 Даратумумаб с недели 25 и далее до прогрессирования заболевания: 16 мг/кг в/в инфузия каждые 4 недели; первую дозу в режиме дозирования каждые 4 недели вводят в неделю 25

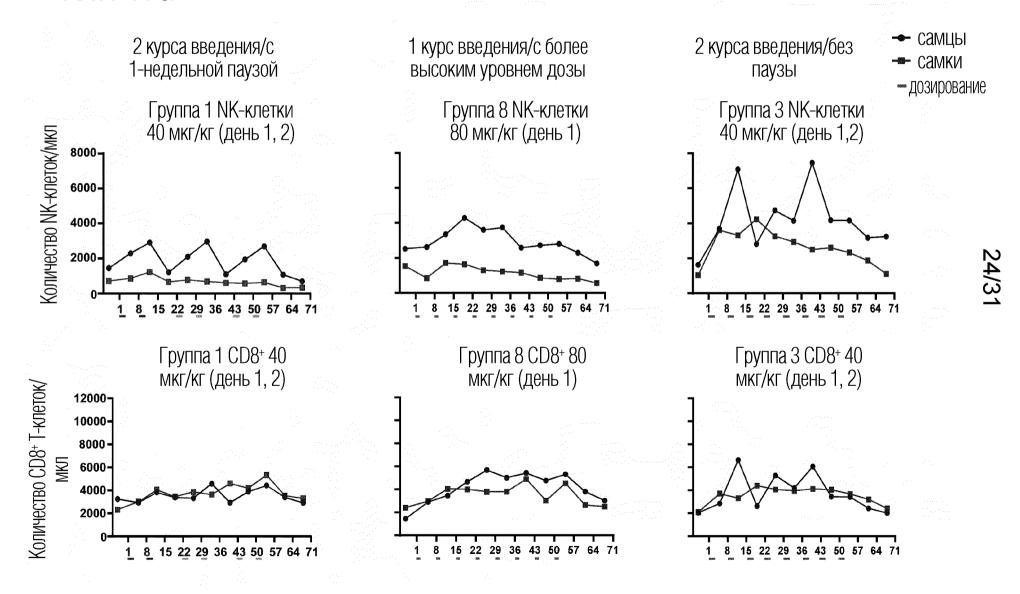


**↑ RLI-15 ↑** даратумумаб

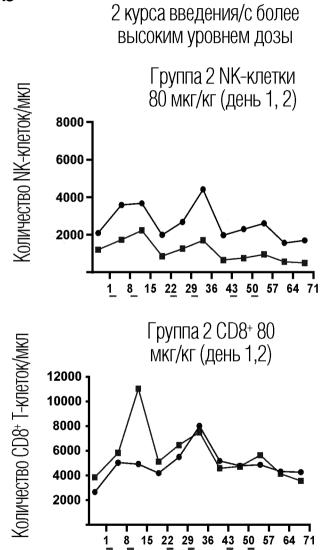


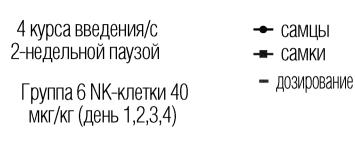


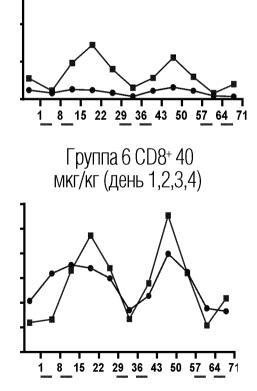
23/3



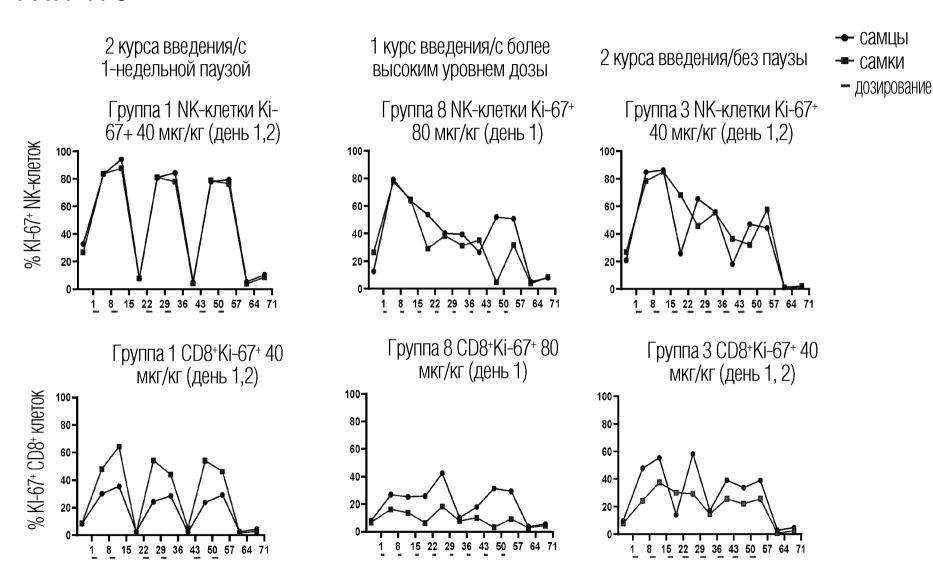
### ФИГ. 17b







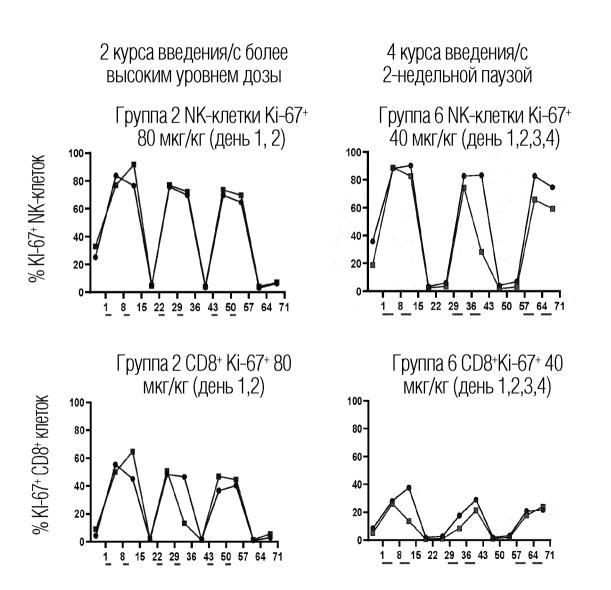
### ФИГ. 17с



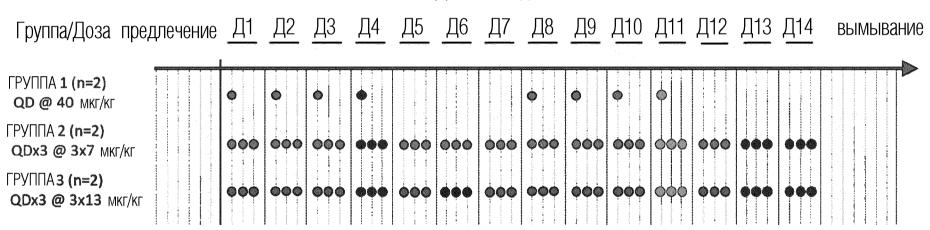
самцы

самки

- дозирование



#### День исследования



28/3

ФИГ. 19

