(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291180 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.06

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(51) Int. Cl. ***A61K 38/20*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АГЕНТЫ, ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ IL-2, В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

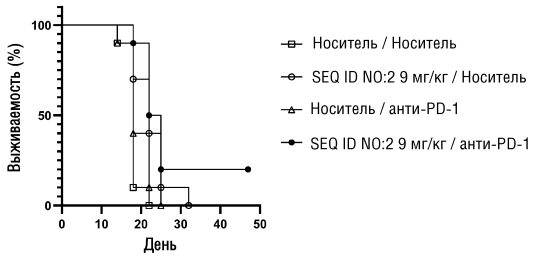
(31) **62/916,936**
(32) **2019.10.18**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2020/000860**
(87) **WO 2021/074689 2021.04.22**

(71) Заявитель:
АЛКЕРМЕС ФАРМА АЙЭЛЕНД ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:
Лоузи Хезер С., Лопес Джаред, Уинквист Реймонд Дж. (US)

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

(57) Изобретение представляет композиции и способы лечения рака у пациента с помощью комбинированной терапии, включающей слитый белок SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек. Предпочтительно у пациента не удалось добиться полного или частичного ответа на предыдущее или продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек.



202291180 A1

202291180 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573849EA/025

АГЕНТЫ, ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ IL-2, В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/916,936, поданной 18 октября 2019 г., полное описание которой настоящим включено в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Слитый белок SEQ ID NO: 1 представляет собой слитый белок варианта интерлейкина-2 (IL-2) человека, сконструированный для селективного связывания рецептора интерлейкина-2 (IL-2) со средней аффинностью, IL-2R βγ. Селективность слитого белка SEQ ID NO: 1 получают путем стабильного слияния IL-2 с круговыми перестановками (cp), слитого с IL-2Rα-цепью (CD25) рецептора IL-2.

Слитый белок SEQ ID NO: 1 имеет преимущества перед нативным IL-2 в качестве терапевтического средства, поскольку его избирательное таргетирование и активация IL-2R βγ приводит к селективной активации субпопуляций CD8+ клеток и NK-клеток, которые могут управлять противоопухолевыми иммунными ответами. Введение слитого белка SEQ ID NO: 1 полезно для онкологических больных, поскольку он снижает иммунодепрессивные эффекты регуляторных Т-клеток, таких как CD4+ Т-клетки, одновременно увеличивая количество CD8+ Т-клеток памяти, тем самым рекрутируя собственную иммунную систему пациента для элиминации раковых клеток. Слитый белок SEQ ID NO: 1 также проявляет длительные эффекты после введения, тем самым дополнительно улучшая ответ пациента на лечение.

Белки иммунных контрольных точек регулируют функцию Т-клеток в иммунной системе. Т-клетки играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Белки контрольных точек взаимодействуют со специфическими лигандами, которые посылают сигнал Т-клеткам и, по существу, выключают или ингибируют функцию Т-клеток. Раковые клетки пользуются преимуществами этой системы, обеспечивая высокий уровень экспрессии белков контрольных точек на их поверхности, что приводит к контролю над Т-клетками, экспрессирующими белки контрольных точек, на поверхности регуляторных Т-клеток, которые входят в микроокружение опухоли, тем самым подавляя противораковый иммунный ответ. Как таковое, ингибирование белков контрольных точек приведет к восстановлению функции Т-клеток и иммунного ответа на раковые клетки.

Примеры белков иммунных контрольных точек включают, но не ограничены ими, CTLA-4, PDL1 (B7-H1, CD274), PDL2 (B7-DC, CD273), PD1, B7-H3 (CD276), B7-H4 (B7-S1, B7x, VCTN1), BTLA (CD272), HVEM, TIM3 (HAVcr2), GAL9, LAG3 (CD223), VISTA, KIR, 2B4 (CD244; принадлежит семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK, γδ и $CD8^+$ памяти (αβ) Т-клетках), CD160 (также обозначаемый как BY55), CGEN-15049, киназы CHK 1 и CHK2, OX40, A2aR и различные лиганды семейства B-7. Ингибиторы

иммунных контрольных точек, которые получили ускоренное одобрение от Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения рака, включают ипилимумаб (YERVOY®), пембролизумаб (KEYTRUDA®), атезолизумаб (TECENTRIQ®), дурвалумаб (IMFINZ®), авелумаб (BAVENCIO®) и ниволумаб (OPDIVO®). YERVOY® представляет собой моноклональное антитело, таргетирующее CTLA-4 на поверхности Т-клеток, и одобренное для лечения меланомы. KEYTRUDA® таргетирует PD-L1 и используется для лечения меланомы и немелкоклеточного рака легкого. OPDIVO® также воздействует на PD-1 и одобрен для лечения меланомы, почечно-клеточного рака и немелкоклеточного рака легкого.

Хотя клинические исследования, например, с ниволумабом и пембролизумабом продемонстрировали противоопухолевую активность и установили эффективность, активность и преимущества анти-PD-1 терапии в популяции пациентов с HNSCC, получавших платину, с рецидивирующими метастазами, например, частота ответа остается низкой, и количество пациентов, у которых случился рецидив или не удалось достичь полного ответа, остается в подавляющем большинстве 85% или более. Поскольку пациенты с HNSCC страдают от огромной заболеваемости и смертности от этого заболевания, и эффективность любой химиотерапии одним агентом остается низкой без проверенных вариантов спасения в этой популяции, которая потерпела неудачу при анти-PD-1 терапии, существует исключительно высокая неудовлетворенная потребность в открытии новых методов лечения или эффективной комбинированной иммунотерапии для усиления, улучшения или восстановления ответов на анти-PD-1 терапию.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение представляет композиции, способы и комбинированные схемы лечения рака у пациента путем введения пациенту комбинации слитого белка SEQ ID NO: 1 и ингибитора иммунных контрольных точек, такого как ингибитор, который блокирует пары рецептор/лиганд, такие как CTLA-4 или PD-1.

Предпочтительно, способы по изобретению включают: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек; где стадия (i) может проводиться до, после или одновременно со стадией (ii), где схема комбинированного лечения лечит рак у пациента. Предпочтительно, пациент ранее не достиг полного или частичного ответа на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек согласно критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или, предпочтительно, согласно критериям irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей). Предпочтительно, где пациент ранее не достиг полного ответа на предшествующее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, согласно критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или согласно критериям irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей). Предпочтительно, где ингибитор

иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой пембролизумаб. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA4 антитело. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ипилимумаб. Предпочтительно, где слитый белок SEQ ID NO: 1 вводят пациенту парентерально. Предпочтительно, где терапевтически эффективное количество SEQ ID NO: 1 представляет собой дозу SEQ ID NO: 1, равную примерно 0,1 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3. мкг/кг, 3,5 мкг/кг, 4 мкг/кг, 4,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 5,5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 7 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 8 мкг/кг, 8,5 мкг/кг, 9 мкг/кг, 9,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 10,5 мкг/кг, 11 мкг/кг, 11,5 мкг/кг, 12 мкг/кг, 12,5 мкг/кг, 13 мкг/кг, 13,5 мкг/кг, 14 мкг/кг или 14,5 мкг/кг.

Предпочтительно, способы по изобретению также представляют комбинированные схемы лечения рака у пациента, включающие: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества варианта слитого белка SEQ ID NO: 1, где вариант имеет аминокислотную последовательность, которая примерно на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 1 на непрерывном участке от около 20% до 100% полной длины SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек; где стадию (i) проводят до, после или одновременно со стадией (ii). Предпочтительно, пациент ранее не достиг полного или частичного ответа на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек согласно критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или, предпочтительно, согласно критериям irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей). Предпочтительно, где пациент ранее не достиг полного ответа на предшествующее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, согласно критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или согласно критериям irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей). Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой пембролизумаб. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA4 антитело. Предпочтительно, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ипилимумаб. Предпочтительно, где слитый белок SEQ ID NO: 1 вводят пациенту парентерально. Предпочтительно, где терапевтически эффективное количество SEQ ID NO: 1 представляет собой дозу SEQ ID NO: 1, равную примерно 0,1 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3 мкг/кг, 3,5 мкг/кг, 4 мкг/кг, 4,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 5,5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 7 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 8 мкг/кг, 8,5 мкг/кг, 9 мкг/кг, 9,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 10,5 мкг/кг, 11 мкг/кг, 11,5 мкг/кг, 12 мкг/кг, 12,5 мкг/кг, 13 мкг/кг, 13,5 мкг/кг, 14 мкг/кг или 14,5 мкг/кг.

В другом аспекте, в описании представлен способ лечения рака у пациента,

нуждающегося в этом, включающий:

i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта; и

ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек;

где стадию (i) проводят до, после или одновременно со стадией (ii),

где у пациента ранее не удавалось достичь полного или частичного ответа на предшествующее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, и

где вариант слитого белка, по меньшей мере, на 80% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления, у пациента ранее не был достигнут полный или частичный ответ на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, как определено по критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или в соответствии с критериями irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей).

В одном варианте осуществления у пациента ранее не был достигнут полный ответ на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, как определено по критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или в соответствии с критериями irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей).

В одном варианте осуществления, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. В одном варианте осуществления, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой пембролизумаб.

В одном варианте осуществления, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA4 антитело. В одном варианте осуществления, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ипилимумаб.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту парентерально. В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно. В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно.

В одном варианте осуществления, терапевтически эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта представляет собой дозу слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта примерно 0,1 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3 мкг/кг, 3,5 мкг/кг, 4 мкг/кг, 4,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 5,5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 7 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 8 мкг/кг, 8,5 мкг/кг, 9 мкг/кг, 9,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 10,5 мкг/кг, 11 мкг/кг, 11,5 мкг/кг, 12 мкг/кг, 12,5 мкг/кг, 13 мкг/кг, 13,5 мкг/кг, 14 мкг/кг или 14,5 мкг/кг.

В одном варианте осуществления, слитый белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту в дозе примерно 3 мкг/кг. В одном варианте осуществления, слитый

белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 3 мкг/кг.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту ежедневно в течение пяти дней подряд.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту в дозе примерно 0,3 мг, примерно 0,6 мг, примерно 1 мг, примерно 3 мг или примерно 10 мг. В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,3 мг, примерно 0,6 мг, примерно 1 мг, примерно 3 мг или примерно 10 мг.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

В одном варианте осуществления, пембролизумаб вводят пациенту в дозе 200 мг. В одном варианте осуществления, пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе 200 мг. В одном варианте осуществления, пембролизумаб вводят пациенту один раз каждые три недели.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 3 мкг/кг ежедневно в течение пяти дней подряд, каждые три недели, и где пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,3 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 0,3 мг один раз в неделю в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,6 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 0,6 мг один раз в неделю в течение 6 недель перед введением пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 1 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 1 мг один раз в неделю в течение 6 недель перед введением пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 3 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где

слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 3 мг один раз в неделю в течение 6 недель перед введением пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 1 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят подкожно пациенту в виде монотерапии в дозе примерно 1 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель перед введением пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 3 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в виде монотерапии в дозе примерно 3 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 10 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в виде монотерапии в дозе примерно 10 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель перед введением пембролизумаба.

В одном варианте осуществления, пациенту не удалось достичь полной ремиссии (CR) после предыдущей терапии ингибитором иммунных контрольных точек.

В одном варианте осуществления, у пациента наблюдается стабильное заболевание (SD) или частичный ответ (PR) без дальнейшего уменьшения размера опухоли или ответа после предыдущей терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

В одном варианте осуществления, предыдущая терапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа включает одну или несколько из анти-PD-1 терапии, анти-PD-L1 терапии и анти-CTLA-4 терапии.

В одном варианте осуществления, способ приводит к одному или нескольким из следующих исходов для пациента: увеличение продолжительности ответа (DOR), увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), увеличение времени до прогрессирования (TTP) и увеличение общей выживаемости (OS), по сравнению с пациентами, получающими слитый белок SEQ ID NO: 1 или ингибитор иммунных контрольных точек в качестве монотерапии,

В одном варианте осуществления, рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака яичников, колоректального рака, меланомы и рака молочной железы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигурах 1А и 1В показаны схемы структурных моделей слитого белка SEQ ID

NO: 1 (Фигура 1A) и его селективного IL-2 со средней аффинностью связывания (Фигура 1B). Структурные модели на Фигурах 1A и 1B созданы с использованием экспериментально определенной кристаллической структуры четвертичного комплекса IL-2 человека, связанного с трехмерным высокоаффинным рецептором (Wang et al., Science. 2005;310(5751):1159-1163. doi: 10.1126/science.1117893).

На Фигуре 2 представлен дизайн исследования, описанного в Примере 1. Для схемы пембролизумаба: 200 мг один раз Q3W ВВ инфузией. Для схемы слитого белка SEQ ID NO: 1: 3 мкг/кг, вводимые ежедневно в течение 5 дней подряд в дни 1-5 первой недели каждого 3-недельного цикла лечения. Сокращения: CR=полный ответ, HNSCC=плоскоклеточная карцинома головы и шеи, PD-(L)1=лиганд-1 запрограммированной смерти клеток; PR=частичный ответ; SD=стабильное заболевание; Q3W=каждые 3 недели.

На Фигуре 3 представлен дизайн исследования, описанного в Примере 1. Сокращения: ВВ=внутривенно, Q3W=каждые 3 недели.

На Фигурах 4A-4C показано иммунофлуоресцентное окрашивание маркеров лимфоцитарной инфильтрации опухоли до и после введения слитого белка SEQ ID NO: 1. На Фигуре 4A, CD3 и CD8 окрашены в альтернативные цвета, и наблюдается наложение между CD3 и CD8. На фигуре 4B, CD8 и гранзим B окрашены в альтернативные цвета, и наблюдается наложение между CD8 и гранзимом B. На фигуре 4C, PD-L1 и онкомаркер окрашены в альтернативные цвета, и наблюдается наложение. Окрашивание опухолевого маркера используют для выделения опухолевых клеток на каждой панели.

На Фигурах 5A и 5B графически представлены средний объем опухоли (Фигура 5A) и выживаемость (Фигура 5B) у мышей с моделью колоректальной опухоли MC38, получающих: слитый белок SEQ ID NO: 2 в комбинации с анти-PD-1 антителом; только слитый белок SEQ ID NO: 2; только анти-PD-1 антитело; или контрольный носитель.

На Фигурах 6A и 6B графически представлены средний объем опухоли (Фигура 6A) и выживаемость (Фигура 6B) у мышей с моделью колоректальной опухоли MC38, получающих: слитый белок SEQ ID NO: 2 в комбинации с анти-CTLA-4 антителом; только слитый белок SEQ ID NO: 2; только анти-CTLA-4 антитело; или контрольный носитель.

На Фигурах 7A и 7B графически представлены средний объем опухоли (Фигура 7A) и выживаемость (Фигура 7B) у мышей с моделью опухоли меланомы B16F10, получающих: слитый белок SEQ ID NO: 2 в комбинации с анти-CTLA-4 антителом; только слитый белок SEQ ID NO: 2; только анти-CTLA-4 антитело; или контрольный носитель.

На Фигурах 8A и 8B графически представлены средний объем опухоли (Фигура 8A) и выживаемость (Фигура 8B) у мышей с моделью опухоли молочной железы EMT-6, получающих: слитый белок SEQ ID NO: 2 в комбинации с анти-PD-1 антителом; только слитый белок SEQ ID NO: 2; только анти-PD-1 антитело; или контрольный носитель.

На Фигурах 9A и 9B графически представлены средний объем опухоли (Фигура

9A) и выживаемость (Фигура 9B) у мышей с моделью опухоли молочной железы EMT-6, получающих: слитый белок SEQ ID NO: 2 в комбинации с анти-CTLA-4 антителом; только слитый белок SEQ ID NO: 2; только анти-CTLA-4 антитело; или контрольный носитель.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы практике или тестировании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на «подложку» включает множество подложек. В этом описании и в последующей формуле изобретения будет сделана ссылка на ряд терминов, которые должны быть определены как имеющие следующие значения, если только не очевидно противоположное намерение. Также отмечается, что термин «содержащий» предназначен для того, чтобы быть открытым и допускает, но не требует включения дополнительных элементов или стадий. При использовании в настоящем документе термина «содержащий», термин «состоящий из» также охватывается и описывается.

Следует отметить, что соотношения, концентрации, количества и другие числовые данные могут быть выражены в настоящем документе в формате диапазона. Следует понимать, что такой формат диапазона используется для удобства и краткости и, таким образом, должен интерпретироваться в гибкой форме, как включающий не только численные значения, конкретно указанные как пределы интервала, но также как включающий все индивидуальные численные значения или поддиапазоны, охватываемые этим диапазоном, как если бы каждое численное значение и поддиапазон были явно указаны. Чтобы проиллюстрировать, диапазон концентраций от «примерно 0,1% до примерно 5%» следует интерпретировать как включающий не только явно указанную концентрацию от примерно 0,1% масс. до примерно 5% масс., но также включающий отдельные концентрации (например, 1%, 2%, 3% и 4%) и поддиапазоны (например, 0,5%, 1,1%, 2,2%, 3,3% и 4,4%) в пределах указанного диапазона. Термин «примерно» может включать ±1%, ±2%, ±3%, ±4%, ±5%, ±6%, ±7%, ±8%, ±9% или ±10% или более числового значения(ий), которые модифицируются. Кроме того, фраза «примерно от 'x' до 'y'« включает «от примерно 'x' до примерно 'y'«.

Термин «белок» или «пептид», используемый в настоящем документе, относится, по меньшей мере, к двум или нескольким аминокислотным остаткам, связанным друг с другом пептидной связью. Аминокислотная последовательность в белке или пептиде

показана в стандартном формате, т. е. от амино-конца (N-конца) к карбоксильному концу (С-концу).

Термин «слитый белок» обозначает белок или пептид, соединенный вместе с другим белком или пептидом пептидной связью между их соответствующими N- и С-концевыми аминокислотными остатками или наоборот, или путем вставки первого белка или пептида во внутреннюю область второго белка или пептида двумя пептидными связями на N- и С-концах вставленного белка или пептида. Пептидная связь представляет собой ковалентную химическую связь, образованную между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой аминокислоты. Слитый белок получают путем экспрессии гена слитого белка в экспрессирующем хозяине, в котором кодирующая последовательность первого белка или пептида связана с кодирующей последовательностью второго белка или пептида.

Изобретение также рассматривает использование «варианта» слитого белка SEQ ID NO: 1, имеющего аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности, которая составляет примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше на непрерывном участке примерно из 20 аминокислот до полной длины слитого белка SEQ ID NO: 1. Вариант слитого белка SEQ ID NO: 1 может иметь определенную идентичность последовательности по сравнению со слитым белком SEQ ID NO: 1 по определенной длине непрерывных аминокислот (например, «окно сравнения»). Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), способом поиска сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.) или путем ручного выравнивания и визуального контроля (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

«Слитый белок с SEQ ID NO: 1» также упоминается в настоящем документе как «cpIL-2:IL-2Rα «и описан в публикации заявки PCT № WO 2013/184942. Слитый белок с SEQ ID NO: 1 представляет собой вариант IL-2 с круговой перестановкой (cp), слитый с внеклеточным доменом IL-2Rα части рецептора IL-2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1).

Изобретение также рассматривает применение варианта слитого белка SEQ ID NO: 1, имеющего аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности, которая составляет примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше на непрерывном участке примерно из 20 аминокислот до полной длины слитого белка SEQ ID NO: 1. Вариант слитого белка SEQ ID NO: 1 может иметь определенную идентичность последовательности по сравнению со слитым белком с SEQ ID NO: 1 по определенной длине непрерывных аминокислот (например, «окно сравнения»). Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), способом поиска сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.) или путем ручного выравнивания и визуального контроля (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

Например, вариант слитого белка SEQ ID NO: 1 может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98% или, по меньшей мере, примерно 99% идентичность аминокислотной последовательности к непрерывному участку слитого белка SEQ ID NO: 1 от примерно 20 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до полной длины слитого белка SEQ ID NO: 1.

«Слитый белок с SEQ ID NO: 2» также упоминается в настоящем документе как «cpIL-2:IL-2Rα мыши» и описан в US 16/897,920. Слитый белок SEQ ID NO: 2 представляет собой ортолог мыши слитого белка SEQ ID NO: 1 и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIIS
TSPQGGSSSTQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKD
LQCLEDELGPLRHVLDLTQGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGF
RRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSM
HQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKT
GWTQPQLTCVDGSHHHHHH (SEQ ID NO: 2).

His метка на С-конце слитого белка SEQ ID NO: 2 используется для очистки и

может присутствовать в экспрессируемом белке или, необязательно, может быть удален.

Термин «терапия IL-2» включает введение иммунотерапии на основе IL-2 и связанных с ним биологических функций в качестве иммунотерапии, включая, но не ограничиваясь ими, сохранение $CD4^+$ регуляторных Т-клеток и дифференциацию $CD4^+$ Т-клеток в различные субпопуляции; стимулирование цитотоксической активности $CD8^+$ Т-клеток и NK-клеток и модулирование программ дифференциации Т-клеток в ответ на антиген, стимулирование дифференциации наивных $CD4^+$ Т-клеток в Т-хелперные-1 (Th1) и Т-хелперные-2 (Th2) клетки при ингибировании дифференциации Т-хелперов-17 (Th17). Следовательно, «терапия IL-2», как используется в настоящем документе, включает, но не ограничена ими, иммунотерапию rhIL-2 или вариантом rhIL-2, таким как слитый белок SEQ ID NO: 1.

Термины «высокая доза IL-2» и «HD IL-2» включают дозу интерлейкина-2 (IL-2) примерно или, по меньшей мере, примерно 600000 международных единиц (МЕ)/кг массы тела (кг)/дозу, или примерно или, по меньшей мере, примерно 720000 МЕ/кг/дозу.

Термины «низкая доза IL-2» и «LD IL-2» включают дозу интерлейкина-2 (IL-2) менее примерно 600000 МЕ/кг массы тела/дозу, например, примерно 60000 или примерно 72000 МЕ/кг/дозу, например, от примерно 60000 до примерно 72000 МЕ/кг/дозу.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, которому может быть введена композиция в соответствии с настоящим изобретением, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типовые субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, не относящиеся к человеку и люди) и/или растения. Предпочтительно, «пациент» относится к субъекту-человеку, который может обращаться за или нуждаться в лечении, требовать лечения, получает лечение, будет получать лечение, или субъекту, находящемуся под наблюдением специалиста, обученного лечению конкретного заболевания или состояния.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соответствующих разумному соотношению польза/риск.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которым вводят соединение по настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемый эксципиент, как правило, представляет собой вещество, которое является нетоксичным, биологически переносимым и иным образом биологически подходящим для введения субъекту, такое как инертное вещество, добавляемое в фармакологическую композицию или иным образом используемое в качестве среды, носителя или разбавителя для облегчают введение агента, и совместимое с ним. Примеры эксципиентов включают воду, любые и все растворители, дисперсионные

среды, разбавители или другие жидкие носители, диспергирующие или суспендирующие добавки, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие агенты, смазывающие агенты и подобные, в зависимости от конкретной желаемой дозированной формы. В Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; включенном в настоящий документ в качестве ссылки, описаны различные эксципиенты, используемые в рецептурах фармацевтических композиций, и известные методы их приготовления. За исключением случаев, когда любая обычная среда эксципиента несовместима с веществом или его производными, например, вызывает какой-либо нежелательный биологический эффект или иным образом взаимодействует неблагоприятным образом с любым другим компонентом(ами) фармацевтической композиции, предполагается, что его применение входит в объем настоящего описания.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» относится к частичной или полной задержке начала инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной задержке появления одного или нескольких симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению появления одного или нескольких симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; и/или снижению риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Термин «метод рекомбинантной ДНК» относится к методам манипулирования и объединения двух или нескольких последовательностей ДНК вместе, которые включают рекомбинацию, ПЦР (полимеразную цепную реакцию), мутагенез in vitro и прямой синтез ДНК. Эти методы описаны в многочисленных опубликованных книгах и руководствах, включая «Current protocols in molecular biology» (Ausubel eds. 2008. John Wiley & Son).

В настоящем документе, любая форма введения или совместное введение «комбинации», «комбинированной терапии» и/или «схемы комбинированного лечения» относится к, по меньшей мере, двум терапевтически активным лекарственным средствам или композициям, которые можно вводить или совместно вводить, одновременно, либо в отдельных, либо в комбинированных составах, либо последовательно в разное время, разделенное минутами, часами или днями, но которые каким-то образом действуют вместе для обеспечения желаемого терапевтического ответа.

Используемый в настоящем документе термин «парентеральная» относится к дозированным формам, которые предназначены для введения в виде инъекции или инфузии, и включает подкожную, внутривенную, внутриартериальную, внутрибрюшинную, внутрисердечную, подоболочечную и внутримышечную инъекцию, а также инфузионные инъекции, обычно внутривенным путем.

Термин «терапевтический агент» охватывает любой агент, вводимый для лечения симптома или заболевания у индивидуума, нуждающегося в таком лечении. Такой

дополнительный терапевтический агент может содержать любые активные ингредиенты, подходящие для лечения конкретных показаний, предпочтительно, с дополнительными действиями, которые не влияют друг на друга неблагоприятным образом. Предпочтительно, дополнительным терапевтическим агентом является противовоспалительный агент.

Термин «химиотерапевтический агент» относится к соединению или его производному, которое может взаимодействовать с раковой клеткой, тем самым снижая пролиферативный статус клетки и/или убивая клетку, например, путем нарушения клеточного деления или синтеза ДНК, или путем повреждения ДНК, эффективно таргетируя быстро делящиеся клетки. Примеры химиотерапевтических агентов включают, но не ограничены ими, алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ифосфамид); метаболические антагонисты (например, метотрексат (MTX), 5-фторурацил или их производные); замещенный нуклеотид, замещенный нуклеозид, деметилирующие ДНК агенты (также известные как антиметаболиты, например, азацитидин), противоопухолевые антибиотики (например, митомицин, адриамицин), противоопухолевые агенты растительного происхождения (например, винкристин, виндезин, TAXOL®, паклитаксел, абраксан); цисплатин, карбоплатин, этопозид и подобные. Такие агенты могут дополнительно включать, но не ограничены ими, противораковые агенты триметотрексат (TMTX), темозоломид, ралтитрексед, S-(4-нитробензил)-6-тиоинозин (NBMPR); 6-бензигуанидин (6-BG); нитрозомочевины и нитрозомочевина (рабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевину (Аранозу), Кармустин (BCNU, BiCNU), Хлорозотоцин, Этилнитрозомочевину (ENU), Фотемустин, Ломустин (CCNU), Нимустин, N-Нитрозо-N-метилмочевину (NMU), Ранимустин (MCNU), Семустин, Стрептозоцин (Стрептозотоцин)), цитарабин и камптотецин или терапевтическое производное любого из них.

Термины «лечить» или «лечение» заболевания (или состояния, или нарушения), используемые в настоящем документе, относятся к предупреждению возникновения заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, которые могут быть предрасположены к заболеванию, но еще не испытывают или проявляют симптомы заболевания (профилактическое лечение), ингибированию заболевания (замедлению или остановке его развития), облегчению симптомов или побочных эффектов заболевания (включая паллиативное лечение) и регрессии заболевания. Относительно рака, эти термины также означают, что ожидаемая продолжительность жизни индивидуума, пораженного раком, может быть увеличена, или что один или несколько симптомов заболевания будут уменьшены. Относительно рака, «лечение» также включает усиление или продление противоопухолевого ответа у субъекта.

Фраза «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к введению агента субъекту, либо отдельно, либо как часть фармацевтической композиции, и либо в виде разовой дозы, либо в виде серии доз, в количестве, способном оказывать любое поддающееся обнаружению положительное влияние на любой симптом,

аспект или характеристику заболевания, нарушения или состояния при введении субъекту. Терапевтически эффективное количество может быть определено путем измерения соответствующих физиологических эффектов, и может быть скорректировано в связи со схемой дозирования и диагностическим анализом состояния субъекта, и подобное. Например, измерение количества воспалительных цитокинов, продуцируемых после введения, может указывать на то, было ли использовано терапевтически эффективное количество. Что касается рака или патологий, связанных с нерегулируемым клеточным делением, терапевтически эффективное количество относится к такому количеству, которое обладает действием (1) снижения размера опухоли (т.е. регрессии опухоли), (2) ингибирования (то есть замедления до некоторой степени, предпочтительно, остановки) аберрантного деления клеток, например, деления раковых клеток, (3) профилактики или уменьшения метастазирования раковых клеток, и/или (4) облегчения до некоторой степени (или, предпочтительно, устранения) одного или нескольких симптомов, связанных с патологией, связанной или частично вызванной нерегулируемым или аберрантным клеточным делением, включая, например, рак. «Эффективным количеством» также является такое количество, которое приводит к желаемым профилям ФД и ФК и желаемому профилю иммунных клеток при введении терапевтически активных композиций по изобретению.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» относится к частичной или полной задержке начала инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной задержке появления одного или нескольких симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению появления одного или нескольких симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; и/или снижению риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Термин RECIST означает «Критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении» и представляет собой набор правил, установленных и опубликованных в сотрудничестве с международными органами (например, Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC), Национальным институтом рака (NCI) США и Национальным институтом рака Канады), которые определяют, когда онкологические пациенты улучшаются («отвечают»), остаются такими же («стабильными») или ухудшаются («прогрессируют») во время лечения.

Термин iRECIST представляет собой набор правил, опубликованных международными органами, которые обеспечивают лучшую оценку эффекта иммунотерапевтических агентов.

«Выживаемость без прогрессирования (PFS)», используемая в контексте описанных в настоящем документе видов рака, относится к продолжительности времени во время и после лечения рака до объективного прогрессирования опухоли или смерти

пациента. Лечение может быть оценено объективными или субъективными параметрами; включая результаты физического осмотра, неврологического обследования или психиатрической оценки. В предпочтительных аспектах, PFS может быть оценена с помощью централизованной оценки слепого изображения, и дополнительно может быть дополнительно подтверждена ORR или независимой централизованной оценкой в слепом режиме (BICR).

«Общая выживаемость (OS)» может быть оценена по показателю OS в определенные моменты времени (например, 1 год и 2 года) по методу Каплана-Мейера, и соответствующий 95% CI получают на основе формулы Гринвуда с помощью исследуемого лечения для каждого типа опухоли. Показатель OS определяется как доля участников, которые живы на момент времени. OS для участника определяется как время от даты первого введения дозы до даты смерти по любой причине.

В настоящем контексте «полный ответ» (CR) представляет собой исчезновение всех признаков рака в ответ на лечение. Полный ответ также может упоминаться в настоящем документе как «общая ремиссия» или «полная ремиссия».

Используемый в настоящем документе термин «частичный ответ» означает уменьшение размера опухоли или распространенности рака в организме в ответ на лечение. Частичный ответ также может упоминаться в настоящем документе как «частичная ремиссия».

Используемый в настоящем документе термин «рак» должен иметь свое обычное значение как общий термин для заболеваний, при которых аномальные клетки делятся без контроля.

Термин «уменьшение опухоли» или «регрессия опухоли», используемый в настоящем документе, относится к уменьшению размера или объема опухолевой массы, уменьшению числа метастазирующих опухолей у субъекта, снижению пролиферативного статуса (степени в которых размножаются раковые клетки) раковых клеток и подобные.

Термин «улучшение», используемый в настоящем документе, относится к тому, чтобы позволить субъекту или опухолевой клетке улучшить свою способность отвечать на лечение, описанное в настоящем документе. Например, улучшенный ответ может включать увеличение чувствительности, по меньшей мере, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% или более. Используемый в настоящем документе термин «улучшение» может также относиться к увеличению числа субъектов, которые отвечают на лечение, такое как комбинация, включающая химиотерапию, лекарственно-резистентные иммунокомпетентные клетки и ингибиторы иммунных контрольных точек. Например, улучшенный ответ может относиться к общей доле субъектов, которые отвечают на лечение, где доля составляет, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% или более.

«Белки иммунных контрольных точек» регулируют функцию Т-клеток в иммунной системе. Т-клетки играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете.

Белки контрольных точек взаимодействуют со специфическими лигандами, которые посылают сигнал в Т-клетку и по существу выключают или ингибируют функцию Т-клеток. Раковые клетки используют преимущества этой системы, стимулируя высокий уровень экспрессии белков контрольных точек на своей поверхности, что приводит к контролю Т-клеток, экспрессирующих белки контрольных точек на поверхности Т-клеток, которые попадают в микроокружение опухоли, тем самым подавляя противораковый иммунный ответ. Как таковое, ингибирование белков иммунных контрольных точек агентами, называемыми в настоящем документе «ингибиторами (иммунных) контрольных точек» или «ингибиторами контрольных точек», может привести к восстановлению функции Т-клеток и иммунного ответа на раковые клетки. Примеры белков контрольных точек включают, но не ограничены ими: CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, OX40, лиганды семейства B-7 или их комбинации. Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек взаимодействуют с лигандом белка контрольных точек, которым может быть CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, OX40, лиганды семейства B-7 или их комбинации.

Слитый белок SEQ ID NO: 1

Слитый белок варианта рекомбинантного IL-2 человека, описанный в WO 2013/184942, представляет собой вариант IL-2 с круговыми перестановками (cp), слитый с внеклеточным доменом IL-2Rα части рецептора IL-2 (фигура 1) и упоминается в настоящем документе как «слитый белок SEQ ID NO: 1» или имеет следующую аминокислотную последовательность:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1).

Предполагается, что слитые белки, которые тесно связаны с слитым белком SEQ ID NO: 1, такие как слитые белки, имеющие идентичность последовательностей примерно на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокую идентичность к непрерывной последовательности, состоящей, по меньшей мере, из примерно 20 аминокислот вплоть до полной длины слитого белка SEQ ID NO: 1, также может подходить для введения в соответствии со способами по изобретению.

Слитый белок SEQ ID NO: 1 (фигура 1A) сконструирован для селективного связывания и активации IL-2R со средней аффинностью (фигура 1B), но не IL-2R с высокой аффинностью (фигура 1B). Домен IL-2Rα слитого белка SEQ ID NO: 1 служит для пространственного затруднения связывания слитого белка SEQ ID NO: 1 с высокоаффинным IL-2R, но все же позволяет связываться с IL-2R со средней

аффинностью.

Не клинические фармакодинамические (ФД) данные in vitro и in vivo подтверждают селективную передачу сигнала через IL-2 рецептор со средней аффинностью с помощью слитого белка SEQ ID NO: 1, что приводит к активации и размножению эффекторных клеток, таких как NK клетки и CD8+ клетки, при минимизации активации и размножения иммунодепрессивных T_{reg}. Кроме того, in vivo у мышей, мышиный суррогат слитого белка SEQ ID NO: 1 демонстрирует улучшенную переносимость по сравнению с rhIL-2 в дозах, которые вызывают эквивалентное или большее размножение эффекторных клеток (например, NK клеток и CD8+ клеток) по отношению к T_{reg}.

Первые клинические данные человека, описанные в находящейся на совместном рассмотрении заявке на патент США с серийным № 62/860182, указывают на то, что слитый белок SEQ ID NO: 1 активирует размножение CD8+ клеток и NK клеток дозозависимым образом с минимальной, не дозозависимой активацией Treg. Следовательно, слитый белок SEQ ID NO: 1 можно вводить пациентам-людям в концентрации, которая сравнима с высокой дозой rhIL-2 (например, альдеслейкина), вызывающей эквивалентное или большее размножение NK клеток и CD8+ клеток по сравнению с, например, высокой дозой rhIL-2, но с гораздо меньшее (по меньшей мере, в два раза меньшее) относительное размножение иммунодепрессивных Treg по сравнению с высокой дозой rhIL-2 (таблица 2).

Комбинированная терапия с ингибиторами иммунных контрольных точек

Рецидивирующие и метастатические заболевания, включающие, но не ограниченные ими, раки, включающие солидные опухоли, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNCC), почечно-клеточный рак (RCC), печеночно-клеточный рак (HCC), немелкоклеточный рак легкого (NBCLC) и мелкоклеточный рак легкого (SCLC), часто являются рефрактерными или не поддаются лечению с помощью дальнейшей хирургии и/или радиационной терапии. 5-Летняя выживаемость для поздних стадий заболеваний при многих типах рака оценивается как 50% или менее. Например, метастатический и рецидивирующий HNSCC, который больше не поддается местной хирургической/радиационной терапии, связан с высоким уровнем смертности и медианой выживаемости от 6 до 9 месяцев. Терапия первой линии в виде терапии на основе платины в комбинации с 5FU и цетуксимабом предлагает некоторое облегчение и эффективность, но также вызывает высокую токсичность, связанную с лечением. Для пациентов с прогрессированием заболевания после терапии первой линии или с непереносимостью платины или резистентностью к платине, антитела к белку-1 запрограммированной смерти клеток (PD-1), ниволумаб и пембролизумаб, продемонстрировали существенное паллиативное действие. преимущества с отмечающейся длительной регрессией опухоли.

Пембролизумаб показан для лечения пациентов с рецидивирующими или метастатическими солидными опухолями с прогрессированием заболевания на фоне или после химиотерапии, содержащей платину, и эта терапия считается стандартом лечения. Пембролизумаб получил ускоренное одобрение в 2017 г. на основании суммарной

эффективности терапии (ORR) 16% (95% доверительный интервал [CI]: 11, 22) и доли пациентов с полным объективным ответом 5% в не рандомизированном исследовании 174 пациентов с рецидивирующим или метастатическим HNSCC, рефрактерным к платиносодержащей химиотерапии. Пациенты получали пембролизумаб 10 мг/кг каждые 2 недели (Q2W; n=53) или по стандартной схеме 200 мг каждые 3 недели (Q3W; n=121) (Keytruda USPI). Среди 28 ответивших на лечение пациентов, средняя продолжительность ответа (DOR) не был достигнута (диапазон от 2,4+ до 27,7+ месяцев), и ORR и DOR были одинаковыми независимо от схемы дозирования (10 мг/кг Q2W или 200 мг Q3W) или статуса папилломавируса человека (HPV) (Keytruda USPI). Затем, эффективность пембролизумаба была продемонстрирована в одногрупповом исследовании 177 пациентов с HNSCC, ранее получавших лечение платиной и цетуксимабом, у которых ORR составил 16% (95% CI: 11, 23) при медиане DOR 8 месяцев (диапазон от 2+ до 12+ месяцев). Открытое рандомизированное исследование фазы 3, Keynote 040, у пациентов с HNSCC, предварительно получавших лечение платиной, продемонстрировало, что пембролизумаб почти не улучшал первичную конечную точку общей выживаемости (OS) по сравнению с терапией по выбору исследователя; ORR исследования составила 14,6% в группе пембролизумаба к 10,1% при использовании активного препарата сравнения (отношение рисков 0,81, односторонний P=0,0204). Побочные реакции, возникающие у пациентов с HNSCC, в целом были аналогичны таковым у пациентов с меланомой или немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), за исключением повышенной частоты отеков лица (10% для всех степеней; 2,1% для 3-4 степени) и нового или ухудшающегося гипотиреоза (14,6%).

Слитый белок SEQ ID NO: 1 представляет собой сконструированный слитый белок, состоящий из интерлейкина (IL)-2 с круговой перестановкой и рецептора IL-2 (R; IL-2R)-α, сконструированный для селективной активации IL-2R со средней аффинностью, но не высокоаффинного IL-2R. IL-2R со средней аффинностью экспрессируется преимущественно на эффекторных лимфоцитах, которые играют важную роль в управлении противоопухолевым иммунным ответом. Наоборот, IL-2 (например, рекомбинантный IL-1 человека) предпочтительно активирует высокоаффинный IL-2R, управляя размножением высокоаффинных типов клеток, экспрессирующих IL-2R, включая иммунодепрессивные $CD4^+$ регуляторные Т-клетки (T_{regs}), которые ограничивают противораковую активность рекомбинантного IL-2 человека (альдеслейкина).

Слитый белок SEQ ID NO: 1 представляет собой агонист IL-2Rβ и общих гамма-цепей, двух цепей, которые образуют IL-2R со средней аффинностью. Это тот же рецепторный комплекс, который стимулируется IL-15:IL-15Rα. Соответственно, слитый белок SEQ ID NO: 1 действует аналогично IL-15, в том, что он активирует и размножает $CD8^+$ Т-клетки и естественные киллеры (NK) по сравнению с другими категориями Т-клеток и лимфоцитов. Согласно ранним клиническим данным, как слитый белок SEQ ID NO: 1, так и IL-15 функционируют как факторы роста Т-клеток, оба активируют и индуцируют размножение Т-клеток и NK-клеток. Блокирующие антитела PD-1

«выпускают» Т-клетки, включая Т-клетки, которые могут распознавать и убивать опухолевые клетки. Теоретически, комбинация фактора роста Т-клеток с агентом, который «выпускает» Т-клетки, должна быть синергетической у пациентов с Т-клетками, способными распознавать и убивать раковые клетки. Считается, что онкологические больные, ранее леченные ингибиторами иммунных контрольных точек, например, анти-PD-1 терапией (например, пембролизумабом или ниволумабом), которые потерпели неудачу в достижении полной ремиссии (CR), могут достигнуть частичного или полного ответа опухоли путем добавления слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с терапией анти-PD-1 антителами (например, пембролизумабом или ниволумабом).

Следовательно, в изобретении представлены способы комбинированных схем лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. Способы по изобретению включают: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек, где стадию (i) проводят до, после или одновременно с стадией (ii).

Изобретение также представляет комбинированные схемы лечения рака у пациента, включающие: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества варианта слитого белка SEQ ID NO: 1, где вариант имеет аминокислотную последовательность на примерно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную слитому белку SEQ ID NO: 1 в непрерывной последовательности из примерно 20 аминокислот вплоть до полной длины слитого белка SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек, где стадию (i) проводят до, после или одновременно со стадией (ii).

Что касается стадий введения (i) и (ii), эти стадии введения могут быть выполнены в любом порядке (а также одновременно), и изобретение не ограничено в этом отношении. Стадия введения (i) может быть проведена до стадии введения (ii). Стадия введения (ii) может быть проведена до стадии введения (i). Обе стадии введения (i) и (ii) могут быть выполнены одновременно. Стадии введения (i) и/или (ii) могут проводиться многократно. Стадии введения (i) и (ii) могут быть выполнены только один раз.

Предпочтительно, комбинированная терапия по изобретению предназначена для лечения рака у пациента, который не смог достичь полной ремиссии или частичной ремиссии от предшествующего лечения или текущего лечения с использованием ингибитора иммунных контрольных точек отдельно или в комбинации с другими дополнительными противораковыми терапевтическими агентами, как описано в настоящем документе. В настоящем документе, пациент, который не смог достичь полной или частичной ремиссии при лечении ингибитором иммунных контрольных точек, относится к субъекту, который не смог достичь полной ремиссии или частичной ремиссии согласно критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или согласно критериям irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей). Предпочтительно, пациент не смог достичь полной ремиссии от

предшествующего или текущего лечения с использованием ингибитора иммунных контрольных точек отдельно или в комбинации с дополнительным противораковым терапевтическим средством.

Предпочтительно, комбинированная терапия по изобретению лечит рак у субъекта, у которого монотерапия ингибитором белка иммунных контрольных точек или монотерапия слитым белком SEQ ID NO: 1 не может обеспечить полную или частичную ремиссию у пациента.

Предпочтительно, комбинированная терапия по изобретению обеспечивает полную ремиссию рака у пациента в более короткие сроки, чем при лечении только ингибитором иммунных контрольных точек или только слитым белком SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно, эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта представляет собой количество, эффективное, например, для того, чтобы вызвать дозозависимое увеличение циркулирующих NK-клеток и CD8+ клеток у пациента с минимальным, не дозозависимым увеличение циркулирующих Т-регуляторных (Treg) клеток. Предпочтительно, увеличение циркулирующих NK-клеток и CD8+ клеток, по сравнению с увеличением циркулирующих Т-регуляторных (Treg), больше у пациента, которому вводили слитый белок SEQ ID NO: 1.

Специалист в данной области техники может определить эффективное количество с помощью стандартных анализов, таких как FACS анализ клеток или тканей, леченных слитым белком SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии с ингибитором иммунных контрольных точек, как описано в настоящем документе в Примерах.

В общем, параметры дозирования монотерапии слитым белком SEQ ID NO: 1 или любой из комбинированных терапий, описанных в настоящем документе, требуют, чтобы количество дозирования было меньше, чем количество, которое может быть необратимо токсичным для субъекта (т.е. максимально переносимая доза, «MTD») и не меньше количества, необходимого для оказания измеримого действия на субъекта. Такие количества определяются, например, фармакокинеическими и фармакодинамическими параметрами, связанными с ADME, с учетом пути введения и других факторов.

Эффективная доза (ED) представляет собой дозу или количество агента, вызывающего терапевтический ответ или желаемый эффект у некоторой части субъектов, принимающих его. «Средняя эффективная доза» или ED50 агента представляет собой дозу или количество агента, которое вызывает терапевтический ответ или желаемый эффект у 50% популяции, которой его вводят. Хотя ED50 обычно используется как мера разумного ожидания эффекта агента, она не обязательно является той дозой, которую клиницист может счесть подходящей для приема, принимая во внимание все соответствующие факторы. Таким образом, в некоторых ситуациях, эффективное количество может быть больше, чем рассчитанная ED50, в других ситуациях, эффективное количество может быть меньше, чем рассчитанная ED50, и в третьих ситуациях, эффективное количество может быть таким же, как и рассчитанная ED50.

Кроме того, эффективной дозой слитого белка SEQ ID NO: 1 может быть количество, которое при введении субъекту в одной или нескольких дозах дает желаемый результат, по сравнению со здоровым субъектом. Например, для субъекта, страдающего конкретным нарушением, эффективной дозой может быть доза, которая улучшает диагностический параметр, показатель, маркер и подобное для этого нарушения, по меньшей мере, примерно на 5%, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или более 90%, где 100% определяется как диагностический параметр, показатель, маркер и подобное, демонстрируемый нормальным субъектом.

Изобретение относится к дозировкам, содержащимся в «стандартной дозированной форме». Фраза «стандартная дозированная форма» относится к физически дискретным единицам, каждая из которых содержит заданное количество слитого белка SEQ ID NO: 1, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими ингибиторами, иммунных контрольных точек и необязательно одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, достаточными для получения желаемого эффекта. Следует понимать, что параметры стандартной дозированной формы будут зависеть от конкретного средства и эффекта, который должен быть достигнут.

Предпочтительно, эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1, которое представляет собой количество, вводимое пациенту, охватывается одним или несколькими из следующих диапазонов: от примерно 0,01 до 1 мг/кг; от примерно 0,01 мг/кг до примерно 0,1 мг/кг; от примерно 1 мг/кг до примерно 1000 мг/кг; от примерно 2 мг/кг до примерно 900 мг/кг; от примерно 3 мг/кг до примерно 800 мг/кг; от примерно 4 мг/кг до примерно 700 мг/кг; от примерно 5 мг/кг до примерно 600 мг/кг; от примерно 6 мг/кг до примерно 550 мг/кг; от примерно 7 мг/кг до примерно 500 мг/кг; от примерно 8 мг/кг до примерно 450 мг/кг; от примерно 9 мг/кг до примерно 400 мг/кг; от примерно 5 мг/кг до примерно 200 мг/кг; от примерно 2 мг/кг до примерно 150 мг/кг; от примерно 5 мг/кг; до примерно 100 мг/кг; от примерно 10 мг/кг до примерно 100 мг/кг; и от примерно 10 мг/кг до примерно 60 мг/кг.

Предпочтительно изобретение представляет фармацевтические композиции для подкожного введения, содержащие фиксированную дозу слитого белка SEQ ID NO: 1, равную, по меньшей мере, примерно 0,3 мг, 1 мг, 1,5 мг, 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 3,5 мг, 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг, 10 мг, 10,5 мг, 11 мг, 11,5 мг, 12 мг, 12,5 мг, 13 мг, 13,5 мг, 14 мг, 14,5 мг, 15 мг, 15,5 мг, 16 мг, 16,5 мг, 17 мг, 17,5 мг, 18 мг, 18,5 мг, 19 мг, 19,5 мг, 20 мг, 20,5 мг, 21 мг, 21,5 мг, 22 мг, 22,5 мг, 23 мг, 23,5 мг, 24 мг, 24,5 мг, 25 мг, 25,5 мг, 26 мг, 26,5 мг, 27 мг, 27,5 мг, 28 мг, 28,5 мг, 29 мг, 29,5 мг или 30 мг слитого белка SEQ ID NO: 1. Фармацевтические композиции по изобретению могут необязательно включать фармацевтически приемлемый эксципиент.

Предпочтительно, изобретение относится к фармацевтическим композициям для подкожного введения, содержащим дозу слитого белка SEQ ID NO: 1 в пересчете на мг/кг, как часто необходимо для педиатрических пациентов, например, изобретение представляет слитый белок SEQ ID NO: 1 в дозе примерно 0,1 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3 мкг/кг, 3,5 мкг/кг, 4 мкг/кг, 4,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 5,5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 7 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 8 мкг/кг, 8,5 мкг/кг, 9 мкг/кг, 9,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 10,5 мкг/кг, 11 мкг/кг, 11,5 мкг/кг, 12 мкг/кг, 12,5 мкг/кг, 13 мкг/кг, 13,5 мкг/кг, 14 мкг/кг, 14,5 мкг/кг или соответствующей фиксированной дозе в пересчете на ребенка весом от примерно 12 до примерно 50 кг или более или на взрослого человека весом 60-70 кг.

Эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек может не совпадать с эффективным количеством слитого белка SEQ ID NO: 1 при доставке в виде монотерапии. Однако, до тех пор, пока комбинированная схема лечения обеспечивает желаемые результаты, количество слитого белка SEQ ID NO: 1, используемого в комбинированной схеме лечения, считается терапевтически эффективным. Предпочтительно, количество ингибитора иммунных контрольных точек, которое обычно вводят в виде монотерапии, меньше при использовании в комбинации со слитым белком SEQ ID NO: 1.

Схема комбинированного лечения, включающая слитый белок с SEQ ID NO: 1, может включать введение разовой суточной дозы слитого белка SEQ ID NO: 1 в течение ряда последовательных или не последовательных дней. Например, SEQ ID NO: 1 можно вводить в дни 1-5 лечения с периодом отдыха от 1 дня до 28 дней, в то время как ингибитор иммунных контрольных точек можно вводить в день 1 лечения и один раз в 21 день (т.е. раз в три недели) после этого, до тех пор, пока продолжается лечение.

Фактическая доза и частота введения слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с белком-ингибитором иммунных контрольных точек будет варьироваться в зависимости от возраста, веса и общего состояния субъекта, а также тяжести состояния, подлежащего лечению, суждения медицинского работника и вводимого конъюгата. Дозировка и частота могут также быть установлены на основе того, отвечает ли пациент на одно или несколько соединений в комбинации. Например, пациенты могут отвечать только на отдельные агенты, а также на комбинацию, но быть более чувствительными к комбинации. В качестве дополнительного примера, пациенты могут не отвечать на один из отдельных агентов, но отвечать на комбинацию. В качестве еще одного примера, пациенты могут не отвечать ни на один из отдельных агентов, но отвечать на их комбинацию.

Способы комбинированной терапии, описанные в настоящем документе, включают введение, по меньшей мере, одного ингибитора иммунных контрольных точек в комбинации со слитым белком SEQ ID NO: 1. Изобретение не ограничивается каким-либо конкретным ингибитором иммунных контрольных точек, при условии, что ингибитор иммунных контрольных точек ингибирует одну или несколько активностей белков контрольных точек-мишеней при введении в эффективном количестве в виде монотерапии или в комбинации со слитым белком SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях,

благодаря, например, синергическим эффектам, минимальное ингибирование белка иммунных контрольных точек ингибитором иммунных контрольных точек может быть достаточным в присутствии слитого белка SEQ ID NO: 1. Многие ингибиторы иммунных контрольных точек известны в данной области техники, например, ниже приведен список одобренных FDA ингибиторов иммунных контрольных точек:

- ипилимумаб (YERVOY®)
- пембролизумаб (KEYTRUDA®)
- атезолизумаб (TECENTRIQ®)
- дурвалумаб (IMFINZ®)
- авелумаб (BAVENCIO®)
- ниволумаб (OPDIVO®)
- цемиплимаб (LIBTAYO®).

Дополнительные примеры анти-PD-1 антител в клинике включают, но не ограничены ими, синтилимаб (TYVYT®), торипалимаб (JS001), камрелизумаб (AiRuiKa™), тислелизумаб (BGB-A317), спартализумаб (PDR001), ретифанлимаб (MGA012), балстилимаб (AGEN2034), цетрелимаб (JNJ-63723283), достарлимаб (TSR-042) и сасанлимаб (PF-06801591).

Примеры белков иммунных контрольных точек (лигандов и рецепторов), некоторые из которых селективно активируются в различных типах опухолевых клеток, которые являются кандидатами на блокаду, включают PD1, PDL1, BTLA, CTLA4, TIM3, LAG3, A2aR и рецепторы подавления цитотоксичности.

CTLA4 (антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов; также известный как CD152). Рецептор иммунных контрольных точек CTLA4 принадлежит суперсемейству рецепторов иммуноглобулинов, которое также включает PD1, BTLA, лимфоцитарный аттенюатор, TIM3 и V-доменный иммуноглобулиновый супрессор активации Т-клеток. CD80 (также известный как B7.1) и CD86 (также известный как B7.2) были идентифицированы как лиганды рецептора CTLA4. CTLA4, первый рецептор иммунных контрольных точек для клинического таргетирования, экспрессируется исключительно на Т-клетках, где он в первую очередь регулирует амплитуду ранних стадий активации Т-клеток. Было показано, что он противодействует активности костимулирующего рецептора Т-клеток CD28. При распознавании антигена, передача сигналов CD28 сильно амплифицирует передачу сигналов Т-клеточных рецепторов для активации Т-клеток. [См., например, Riley et al., (2002) Proc. Natl Acad. Sci. USA 99:11790-95]. CTLA4 транскрипционно индуцирует последующую активацию Т-клеток. Хотя CTLA4 экспрессируется активированными CD8+ эффекторными Т-клетками, считается, что его первичная физиологическая роль проявляется в различных эффектах на два основных подмножества CD4+ Т-клеток: i) подавление активности хелперных Т-клеток и ii) усиление иммунодепрессивной активности регуляторных Т-клеток. В частности, блокада CTLA4 приводит к усилению иммунного ответа в зависимости от хелперных Т-клеток, в то время как привлечение CTLA4 регуляторных Т-клеток увеличивает их депрессивную функцию [см., например,

Fontenot et al., (2003) Nat. Immunol. Proc. 4:330-36].

Описаны различные экспериментальные подходы к таргетированию сигнального пути CTLA4 с использованием анти-CTLA4 антагонистических антител. Эти подходы были оценены для выявления потенциальной полезности таких антител при раке (например, опухолях) и инфекционных состояниях. Например, IL-10 ранее был вовлечен в CTLA4-опосредованное подавление противоопухолевого иммунного ответа (Jovasevic et al., (2004) J. Immunol. 172:1449-54). Когда оно было одобрено для лечения меланомы в 2011 г., полностью гуманизированное CTLA4 моноклональное антитело ипилимумаб (YERVOY; Bristol-Myers Squibb) стало первым ингибитором иммунных контрольных точек, получившим одобрение регулирующих органов в США. Другой агент, тремелимумаб (ранее тицилимумаб; MedImmune) в настоящее время проходит клинические испытания, например, для лечения гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы и мезотелиомы.

Сигнальный путь CD28 также таргетируется с применением антагонистического CTLA4-Ig для потенциального применения при аутоиммунных состояниях и состояниях, связанных с трансплантацией (Wu et al., (2012) Int. J. Biol. Sci. 8:1420-30). Слитые белки, содержащие CTLA4 и антитело (CTLA4-Ig; абатцепт (ORENCIA; Bristol-Myers Squibb)) использовались для лечения ревматоидного артрита, и было показано, что другие слитые белки эффективны у пациентов с трансплантацией почки, которые сенсибилизированы к вирусу Эпштейн-Барр.

PD1 (белок 1 запрограммированной смерти клеток, также известный как CD279) и PDL1 (лиганд PD1, также известный как B7-H1) и PDL2. PD1 является негативным регулятором активации Т-клеток, который имеет общие структурные свойства с членами семейства CD28. PD1 ограничивает эффекторные функции Т-клеток в тканях. Повышая регуляцию лигандов для PD1, опухолевые клетки блокируют противоопухолевые иммунные ответы в микроокружении опухоли. Как и для многих других ингибиторов иммунных контрольных точек, блокада PD1 обращает вспять истощение Т-клеток, восстанавливает продуцирование цитокинов и увеличивает расширение антигензависимых Т-клеток. PDL1 и PDL2 являются двумя лигандами, которые, как известно, активируют путь PD1. Было показано, что блокада пути PD1-PDL1/PDL2 задерживает рост опухоли и продлевает выживание мышей с опухолями. Кроме того, результаты клинических испытаний на ранней стадии показали, что блокада пути PD1 вызывает устойчивую регрессию опухоли при различных типах опухолей. Для PD1 и PDL1/PDL2, полагают, что наиболее важное взаимодействие происходит в месте опухоли, а не более широко по всей иммунной системе, как это происходит с CTLA-4.

Были оценены различные иммунотерапевтические подходы, которые модулируют путь PD1-PDL1/PDL2 с использованием переноса генов и/или антагонистических антител. Такие подходы показали себя многообещающими при ряде заболеваний, нарушений и состояний, включая трансплантацию, инфекцию, опухоль и аутоиммунные заболевания Wu et al., (2012) Int. J. Biol. Sci. 8:1420-30). Было показано, что V-домен внеклеточного

иммуноглобулина (Ig) PD1 важен для взаимодействия между PD1 и PDL1/PDL2, что предполагает, что hPD1-IgV может быть многообещающей стратегией специфической иммунотерапии опухолей (Zhang et al., (2008) Cytotherapy 10(7):711-10). Антитела к PD1 находятся в стадии разработки (например, ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пидилизумаб (CT-011; CureTech) и ламбролизумаб (Merck)). Ниволумаб показал многообещающие результаты у пациентов с меланомой, раком легких и почек. Комбинированная терапия, включающая ниволумаб и модулятор CTLA-4 ипилимумаб, также оценивается при раке легких. Также оцениваются анти-PDL1 антитела (например, BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), MPDL3280A (Genentech/Roche) и MEDI4736 (MedImmune), а также анти-PDL2 антитела (например, AMP-224 (Amplimmune/GlaxoSmithKline)).

Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой биологический терапевтический агент или малую молекулу. Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, слитый белок или их комбинацию.

Специалист в данной области техники может обратиться к литературе для получения информации об идентификации и тестировании активности любого потенциального ингибитора иммунных контрольных точек, а также об определении подходящей дозировки и частоты, с которой следует вводить ингибитор иммунных контрольных точек отдельно или в комбинации с SEQ ID NO: 1. Количество вводимого ингибитора иммунных контрольных точек, достаточное для стимулирования ингибирования белка контрольной точки, упоминается в настоящем документе как «количество, ингибирующее белок контрольной точки» или диапазон доз. Специалист в данной области техники может обратиться к научной литературе и листкам-вкладышам коммерчески доступных ингибиторов, чтобы установить количества, подавляющие контрольную точку, для применения в комбинированной терапии по изобретению.

Предпочтительно, эффективное количество ингибитора иммунных контрольных точек представляет собой количество, эффективное для того, чтобы вызвать регрессию опухоли в комбинации со слитым белком SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек вводят (в пересчете на кг массы тела пациента) в количестве менее 0,0001 мг/кг, 0,0001-0,001 мг/кг, 0,001-0,01 мг/кг, 0,01-0,05 мг/кг, 0,05-0,1 мг/кг, 0,1-0,2 мг/кг, 0,2-0,3 мг/кг, 0,3-0,5 мг/кг, 0,5-0,7 мг/кг, 0,7-1 мг/кг, 1-2 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг, 4-5 мг/кг, 5-6 мг/кг, 6-7 мг/кг, 7-8 мг/кг, 8-9 мг/кг, 9-10 мг/кг, по меньшей мере, 10 мг/кг или в любой комбинации этих доз. Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек вводят, по меньшей мере, один раз в неделю, по меньшей мере, два раза в неделю, по меньшей мере, три раза в неделю, по меньшей мере, один раз в две недели или, по меньшей мере, один раз в месяц или несколько месяцев. Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек вводят в виде разовой дозы, двух доз, трех доз, четырех доз, пяти доз или 6 или более доз.

Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой

ингибитор иммунных контрольных точек PD1, содержащий одно или несколько анти-PD-1 антител, включая ниволумаб и пембролизумаб. Предпочтительная схема лечения по изобретению комбинирует слитый белок SEQ ID NO: 1 с ингибитором иммунных контрольных точек, пембролизумабом. Предпочтительно, 200 мг пембролизумаба вводят в соответствии с рекомендациями производителя, как правило, один раз каждые три недели или 21 день.

Предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек CTLA4, содержащий одно или несколько анти-CTLA-4 антител, включая ипилимумаб. Предпочтительная схема лечения по изобретению сочетает слитый белок SEQ ID NO: 1 с ингибитором иммунных контрольных точек, ипилимумабом. Предпочтительно, 200 мг ипилимумаба вводят в соответствии с рекомендациями производителя, как правило, один раз каждые три недели или 21 день.

Как правило, терапевтически эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек представляет собой количество, достаточное для активации цитотоксичности CD8+ Т-клеток, для уменьшения или устранения опухоли. Предпочтительно, комбинированная терапия по изобретению приводит к полному ответу на лечение, по меньшей мере, у примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% и примерно 90% или более популяции пациентов, протестированных комбинированной терапией и, предпочтительно, полный ответ представляет собой устойчивый полный ответ.

Предпочтительно, слитый белок SEQ ID NO: 1 вводят при комбинированном лечении рака внутривенной или подкожной инъекцией, и, предпочтительно, ингибитор иммунных контрольных точек вводят внутривенной или подкожной инъекцией. Однако также рассматриваются другие способы введения обоих соединений, такие как легочный, назальный, трансбуккальный, ректальный, подъязычный и трансдермальный. Используемый в настоящем документе термин «парентеральный» относится к дозированным формам, которые предназначены для введения в виде инъекции или инфузии, и включает подкожную, внутривенную, внутриартериальную, внутрибрюшинную, внутрисердечную, интратекальную и внутримышечную инъекцию, а также инфузионные инъекции, как правило, внутривенным путем. Каждый фармакологический компонент способа можно вводить отдельно. Альтернативно, если желательно одновременное введение двух фармакологических компонентов, и два фармакологических компонента совместимы друг с другом и в данном составе, то одновременное введение может быть достигнуто посредством введения одной дозированной формы/состава (например, внутривенное введение внутривенного состава, который содержит оба фармакологически активных агента). Обычный специалист в данной области техники может определить с помощью обычного тестирования того, совместимы ли два заданных фармакологических компонента вместе и в заданном составе.

Композиции, вводимые в соответствии с изобретением, могут дополнительно

содержать фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант и другую фармацевтическую композицию, содержащую одно или несколько терапевтических агентов, таких как терапевтическое антитело, с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адъювантом.

Способы комбинированного лечения, описанные в настоящем документе, можно продолжать до тех пор, пока клиницист, осуществляющий надзор за пациентом, не сочтет способ лечения эффективным. Неограничивающие параметры, указывающие на эффективность способа лечения, включают следующие: уменьшение размера опухоли (по массе и/или объему); уменьшение количества отдельных колоний опухоли; элиминацию опухоли; и выживаемость без прогрессирования (PFS).

Типовые промежутки времени, связанные с описанным в настоящем документе курсом комбинированной терапии, включают: примерно одну неделю; две недели; примерно три недели; примерно четыре недели; примерно пять недель; примерно шесть недель; примерно семь недель; примерно восемь недель; примерно девять недель; примерно десять недель; примерно одиннадцать недель; примерно двенадцать недель; примерно тринадцать недель; примерно четырнадцать недель; примерно пятнадцать недель; примерно шестнадцать недель; примерно семнадцать недель; примерно восемнадцать недель; примерно девятнадцать недель; примерно двадцать недель; примерно двадцать одну неделю; примерно двадцать две недели; примерно двадцать три недели; примерно двадцать четыре недели; примерно семь месяцев; примерно восемь месяцев; примерно девять месяцев; примерно десять месяцев; примерно одиннадцать месяцев; примерно двенадцать месяцев; примерно тринадцать месяцев; примерно четырнадцать месяцев; примерно пятнадцать месяцев; примерно шестнадцать месяцев; примерно семнадцать месяцев; примерно восемнадцать месяцев; примерно девятнадцать месяцев; примерно двадцать месяцев; примерно двадцать один месяц; примерно двадцать два месяца; примерно двадцать три месяца; примерно двадцать четыре месяца; примерно тридцать месяцев; примерно три года; примерно четыре года и примерно пять лет.

Предпочтительно, слитый белок SEQ ID NO: 1 и его фармацевтические композиции в комбинации с одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек для лечения и/или профилактики различных заболеваний, нарушений и состояний (например, рака), воздействуют с использованием конкретных параметров дозирования, которые служат чтобы свести к минимуму любые неблагоприятные эффекты, связанные с введением отдельных видов терапии. Например, добавление слитого белка SEQ ID NO: 1 к схеме, включающей ингибитор иммунных контрольных точек (например, ипилимумаб), может позволить снизить количество ингибитора иммунных контрольных точек, необходимое для достижения терапевтической цели, таким образом уменьшая (или даже устраняя) тяжелые и фатальные иммуноопосредованные побочные реакции, которые вынуждают FDA потребовать предупреждения «в черной рамке» для определенных ингибиторов иммунных контрольных точек (например,

ипилимумаба).

Показания к лечению

Методы комбинированного лечения, описанные в настоящем документе, особенно подходят для лечения рака. Раковые клетки могут проникать в близлежащие ткани и распространяться через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Существует несколько основных типов рака, например, карцинома представляет собой рак, который начинается в коже или в тканях, выстилающих или покрывающих внутренние органы. Саркома представляет собой рак, который начинается в костях, хрящах, жире, мышцах, кровеносных сосудах или других соединительных или поддерживающих тканях. Лейкоз представляет собой рак, который начинается в кроветворных тканях, таких как костный мозг, и вызывает образование большого количества аномальных клеток крови, которые попадают в кровоток. Лимфома представляет собой рак, который начинается в клетках иммунной системы.

Когда нормальные клетки теряют способность вести себя как определенная, контролируемая и скоординированная единица, образуется опухоль. Как правило, солидная опухоль представляет собой аномальную массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей (некоторые опухоли головного мозга имеют кисты и центральные некротические области, заполненные жидкостью). Одна опухоль может даже иметь разные популяции клеток внутри нее, с различными процессами, которые пошли неправильно. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Различные типы солидных опухолей названы по типу образующих их клеток. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (раки крови) обычно не образуют солидных опухолей.

Примеры солидных раковых опухолей, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе схем комбинированного лечения, включают, но не ограничены ими: рак поджелудочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, шейки матки, желудка, эндометрия, головного мозга, печени, яичников, яичек, головы, шеи, кожи (включая меланому и базальную карциному), мезотелиальной выстилки, пищевода, молочной железы, мышц, соединительной ткани, легких (включая мелкоклеточную карциному легкого и немелкоклеточную карциному), надпочечников, щитовидной железы, почек или костей; глиобластому, мезотелиому, рак желудка, саркому, хориокарциному, кожную базально-клеточную карциному и семиному яичка. В предпочтительных аспектах, рак представляет собой рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточную карциному; плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, меланому, лимфому или рак желудка. В более предпочтительных аспектах, рак представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному или карциному желудка. Схемы лечения по изобретению особенно подходят для лечения

солидных опухолей, включая, но не ограничиваясь ими: лимфомы, меланому, почечно-клеточную карциному (RCC), запущенные солидные опухоли, опухоли, которые ранее лечились терапевтической терапией, но остаются резистентными к предыдущим терапиям.

Раки, которые также можно лечить в соответствии с изобретением, включают, но не ограничены ими, острый лимфобластный лейкоз, у взрослых; острый лимфобластный лейкоз, у детей; острый миелоидный лейкоз, у взрослых; адренокортикальную карциному; адренокортикальную карциному, у детей; лимфому, связанную со СПИД; злокачественные новообразования, связанные со СПИД; рак анального канала; астроцитому, у детей, мозжечковую; астроцитому, у детей, церебральную; рак желчных протоков, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря, у детей; рак кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиобластому, у детей; глиобластому, у взрослых; глиому ствола головного мозга, у детей; опухоль головного мозга, у взрослых; опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, у детей; опухоль головного мозга, мозжечковую астроцитому, у детей; опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, у детей; опухоль головного мозга, эпендимому, у детей; опухоль головного мозга, медуллобластому, у детей; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, у детей; опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамическую, у детей; опухоль головного мозга, у детей (другую); рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы, у детей; рак груди, у мужчин; бронхиальные аденомы/карциноиды, у детей: карциноидную опухоль, у детей; карциноидную опухоль, желудочно-кишечного тракта; карциному надпочечников; карциному островковых клеток; карциному неизвестного происхождения, первичную; лимфому центральной нервной системы, первичную; мозжечковую астроцитому, у детей; церебральную астроцитому/злокачественную глиому, у детей; рак шейки матки; детские раки; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные заболевания; светлоклеточную саркому сухожильных влагалищ; рака толстой кишки; колоректального рака, у детей; кожной Т-клеточной лимфомы; рака эндометрия; эпендимомы, у детей; эпителиальный рак яичников; рак пищевода; рак пищевода, у детей; опухоли семейства Юинга; экстракраниальную герминогенную опухоль, у детей; внегонадную герминогенную опухоль; внепеченочный рак желчных протоков, рак глаза, внутриглазную меланому; рак глаза, ретинобластому; рак желчного пузыря; рак ЖКТ (желудка); рак ЖКТ (желудка), у детей; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; опухоль зародышевых клеток, экстракраниальную, у детей; опухоль зародышевых клеток, внегонадную; опухоль зародышевых клеток, яичников; гестационную трофобластную опухоль; глиому, ствола головного мозга, у детей; глиому, зрительного пути и гипоталамуса, у детей; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени), у взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени), у детей (первичный); лимфому Ходжкина, у взрослых; лимфому Ходжкина, у

детей; лимфома Ходжкина во время беременности; гипофарингеальный рак; глиому гипоталамуса и зрительного пути, у детей; внутриглазную меланому; карциному островковых клеток (эндокринный, поджелудочной железы); саркому Капоши; рак почки; рак гортани; рак гортани, у детей; лейкоз, острый лимфобластный, у взрослых; лейкоз, острый лимфобластный, у детей; лейкоз, острый миелоидный, у взрослых; лейкоз, острый миелоидный, у детей; лейкоз, хронический лимфоцитарный; лейкоз, хронический миелогенный; лейкоз, волосатоклеточный; рак губы и полости рта; рак печени, у взрослых (первичный); рак печени, у детей (первичный); рак легкого, немелкоклеточный; рак легкого, мелкоклеточный; лимфобластный лейкоз, у взрослых, острый; лимфобластный лейкоз, у детей, острый; лимфоцитарную лимфому, связанную со СПИД; лимфому центральной нервной системы (первичную); лимфому, кожную, Т-клеточную; лимфому Ходжкина, у взрослых; лимфому Ходжкина; у детей; лимфому Ходжкина во время беременности; лимфому, не ходжкинскую, у взрослых; лимфому, не ходжкинскую, у детей; лимфому, не ходжкинская, во время беременности; лимфому, первичную, центральной нервной системы; макроглобулинемию, Вальденстрема; рак груди, у мужчин; злокачественную мезотелиому, у взрослых; злокачественную мезотелиому, у детей; злокачественную тимому; медуллобластому, у детей; меланому; меланому, внутриглазную; карциному из клеток Меркеля; мезотелиому, злокачественную; метастатическую плоскоклеточную карциному шеи, неидентифицированную, первичную; синдром множественной эндокринной неоплазии, у детей; множественную миелому/плазмоклеточное новообразование; грибковый микоз; миелодиспластические синдромы; миелогенный лейкоз, хронический; миелоидный лейкоз, острый, у детей; миелому, множественную; миелопролиферативные заболевания, хронические; рак полости носа и околоносовых пазух; рак носоглотки; рак носоглотки, у детей; нейробластому; нейрофиброму; неходжкинскую лимфому, у взрослых; неходжкинскую лимфому, у детей; неходжкинскую лимфому во время беременности; немелкоклеточный рак легкого; рак полости рта, у детей; рак ротовой полости и губы; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичников, у детей; эпителиальный рак яичников; зародышевые клеточные опухоли яичников; опухоли яичников с низким потенциалом злокачественности; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы, у детей; рак поджелудочной железы, островковых клеток; рак околоносовых пазух и полости носа; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитому; шишковидные и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, у детей; опухоль гипофиза; новообразование плазматических клеток/множественную миелому; плевропульмональную бластому; беременность и рак молочной железы; беременность и лимфому Ходжкина; беременность и неходжкинскую лимфому; первичную лимфома центральной нервной системы; первичный рак печени, у взрослых; первичный рак печени, у детей; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (почек); почечно-клеточный рак, у детей; почечной лоханки и мочеточника, переходно-клеточный рак; ретинобластому;

рабдомиосаркому, у детей; рак слюнной железы; рак слюнной железы, у детей; саркому, семейства опухолей Юинга; саркому Капоши; саркому (остеосаркому)/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; саркому, рабдомиосаркому, у детей; саркому мягких тканей, у взрослых; саркому мягких тканей, у детей; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи, у детей; рак, рак кожи (меланому); рак кожи из клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей, у взрослых; саркому мягких тканей, у детей; плоскоклеточную карциному шеи, клинически неидентифицированную, первичную, метастатическую; рак желудка (ЖКТ); рак желудка (ЖКТ), у детей; супратенториальные нейроэктодермальные примитивные опухоли, у детей; Т-клеточную лимфому кожи; рак яичка; тимому, у детей; тимому, злокачественную; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы, у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластную опухоль, гестационную; рак с неизвестной первичной локализацией, у детей; необычные раки, у детей; мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак; рак уретры; саркому матки; рак влагалища; глиому зрительного пути и гипоталамуса, у детей; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; и опухоль Вильмса, среди прочих.

Схемы лечения по изобретению особенно подходят для лечения солидных опухолей, включая, но не ограничиваясь ими: лимфомы, меланому, почечно-клеточную карциному (RCC), печеночно-клеточную карциному (HCC), немелкоклеточный рак легкого (NBCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN), а также запущенные солидные опухоли и опухоли, которые ранее лечились противораковой терапией, но остаются рефрактерными к предыдущим методам лечения.

Фармацевтические композиции

Слитый белок SEQ ID NO: 1 и ингибиторы иммунных контрольных точек по настоящему изобретению могут быть в форме одной или нескольких композиций, подходящих для введения субъекту. В общем, такие композиции представляют собой «фармацевтические композиции», содержащие слитый белок SEQ ID NO: 1 и/или ингибитор(ы) иммунных контрольных точек и один или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых разбавителей, носителей или эксципиентов.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы быть совместимыми с предполагаемым способом или путем введения; типовые фармацевтические пути введения изложены в настоящем документе. Кроме того, фармацевтические композиции можно использовать в комбинации с другими терапевтически активными агентами или соединениями, как описано в настоящем документе, для лечения или профилактики заболеваний, нарушений и состояний, рассматриваемых настоящим изобретением.

Фармацевтические композиции обычно содержат терапевтически эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 и один или несколько фармацевтически и

физиологически приемлемых агентов для составов. Подходящие фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые разбавители, носители или эксципиенты включают, но не ограничены ими, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфат натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метилпарабены, этил или н-пропил, п-гидроксибензоат), эмульгаторы, суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, растворители, наполнители, объемообразующие агенты, детергенты, буферы, носители, разбавители и/или адъюванты. Например, подходящим носителем может быть физиологический солевой раствор или забуференный цитратом солевой раствор, возможно дополненный другими материалами, обычно используемыми в фармацевтических композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, также являются типовыми носителями. Специалисты в данной области техники легко узнают множество буферов, которые можно использовать в рассматриваемых в настоящем документе фармацевтических композициях и дозированных формах. Типовые буферы включают, но не ограничены ими, фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси. Например, компоненты буфера могут быть водорастворимыми материалами, такими как фосфорная кислота, винная кислота, молочная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, уксусная кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и их соли. Приемлемые буферные агенты включают, например, Tris буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфонвую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино))этансульфоновая кислота)пропансульфоновую кислоту (MOPS) и N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS).

После составления, фармацевтическая композиция может храниться в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Таких составы могут храниться либо в форме, готовой к применению, либо в другой приемлемой форме, требующей восстановления перед применением, жидкой форме, требующей разбавления перед применением, или другой приемлемой форме.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция представлена в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоинъекторе (подобном, например, EpiPen®)), тогда как многоразовый контейнер (например, многоразовый флакон) предоставляется в других вариантах осуществления. Для доставки IL-10 можно использовать любое устройство для доставки лекарственного средства, включая имплантаты (например, имплантируемые помпы) и катетерные системы, медленные инъекционные помпы и устройства, все из которых хорошо известны специалистам в данной области техники. Инъекции депо, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, также можно использовать для высвобождения

описанных в настоящем документе полипептидов в течение определенного периода времени. Инъекции депо обычно имеют либо твердую, либо масляную основу и, как правило, содержат, по меньшей мере, один из компонентов состава, изложенных в настоящем документе. Специалист в данной области техники знаком с возможными составами и применением инъекций депо.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Эта суспензия может быть составлена в соответствии с известным уровнем техники с использованием упомянутых в настоящем документе подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильным препаратом для инъекций также может быть раствор или суспензия для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и дисперсионные среды, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS), этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно применяют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой ели, можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в приготовлении инъекционных препаратов. Пролонгированное всасывание некоторых инъекционных составов может быть достигнуто путем включения агента, который замедляет всасывание (например, моностеарата алюминия или желатина).

Фармацевтические композиции могут быть в форме, пригодной для перорального применения, например, в виде таблеток, капсул, пастилок, леденцов, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул или сиропов, растворов, микрогранул или эликсиров. Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть приготовлены в соответствии с любым способом, известным в данной области техники для изготовления фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или несколько агентов, таких как, например, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, для получения фармацевтически элегантных и приятных на вкус препаратов. Таблетки, капсулы и подобные содержат активный ингредиент в смеси с не токсичными фармацевтически приемлемыми эксципиентами, которые подходят для изготовления таблеток. Эти эксципиенты могут быть, например, разбавителями, такими как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующими и разрыхляющими агентами, например, кукурузным крахмалом или альгиновой кислотой, связующими агентами, например, крахмалом, желатином или аравийской камедью, и смазывающими агентами, например, стеаратом магния, стеариновой кислотой или тальком.

Таблетки, капсулы и подобные, подходящие для перорального введения, могут

быть не покрытыми или покрытыми известными способами для замедления разрушения и всасывания в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, для обеспечения продолжительного действия. Например, можно использовать материал с временной задержкой, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. Они также могут быть покрыты с помощью методов, известных в данной области техники, для формирования осмотических терапевтических таблеток с контролируемым высвобождением. Дополнительные агенты включают биоразлагаемые или биосовместимые частицы или полимерное вещество, такое как полиэфиры, полиаминокислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, полиангидриды, полигликолевая кислота, этиленвинилацетат, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, сульфат протамина или сополимеры лактида/гликолида, сополимеры полилактида/гликолида, или сополимеры этиленвинилацетата для контроля доставки вводимой композиции. Например, пероральный агент может быть заключен в микрокапсулы, приготовленные методами коацервации или полимеризацией на границе фаз, с использованием гидроксиметилцеллюлозы или желатиновых микрокапсул или поли(метилметакролатных) микрокапсул, соответственно, или в коллоидной системе доставки лекарственных средств. Коллоидные дисперсионные системы включают макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Способы приготовления вышеупомянутых составов будут очевидны специалистам в данной области техники.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция, каолином или микрокристаллической целлюлозой, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

Водные суспензии содержат активные вещества в смеси с эксципиентами, подходящими для их изготовления. Такими эксципиентами могут быть суспендирующие вещества, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие агенты, например встречающийся в природе фосфатид (например, лецитин), или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами (например, полиоксиэтиленстеарат), или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами (например, для гептадекаэтиленоксицетана), или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита (например, моноолеат полиоксиэтиленсорбита), или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита (например, моноолеат полиэтиленсорбитана). Водные суспензии также могут содержать один или несколько

консервантов.

Масляные суспензии могут быть составлены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Для получения приятного перорального препарата можно добавлять подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов приведены в настоящем документе.

Фармацевтические композиции также могут быть в форме эмульсий масло-в-воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например, жидкий парафин, или их смеси. Подходящими эмульгаторами могут быть природные камеди, например, аравийская камедь или трагакантовая камедь; встречающиеся в природе фосфатиды, например, соевые бобы, лецитин и сложные или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот; ангидриды гексита, например, сорбитанмоноолеат; и продукты конденсации неполных эфиров с этиленоксидом, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

Составы также могут включать носители для защиты композиции от быстрого разложения или выведения из организма, такие как составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, липосомы, гидрогели, пролекарства и микрокапсулированные системы доставки. Например, можно использовать материал с временной задержкой, такой как глицерилмоностеарат или только глицерилстеарат или в комбинации с воском.

Суппозитории могут быть приготовлены путем смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим наполнителем, который является твердым при обычной температуре, но жидким при ректальной температуре, и поэтому плавится в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие материалы включают, но не ограничены ими, масло какао и полиэтиленгликоли.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения по изобретению, могут быть в любой форме (например, спреи для назального или ингаляционного применения), известной в настоящее время или разработанной в будущем.

Концентрация слитого белка SEQ ID NO: 1 или ингибитора иммунных контрольных точек в составе может широко варьироваться (например, от менее примерно 0,1%, обычно на уровне или, по меньшей мере, примерно 2% до не менее 20-50% или более по массе) и обычно выбирают, в первую очередь, исходя из объемов жидкости, вязкости и факторов, зависящих от субъекта, в соответствии, например, с выбранным конкретным способом введения.

Дополнительная комбинированная терапия/дополнительные терапевтические агенты

Другие схемы противоракового лечения в дополнительном сочетании с комбинированной терапией слитым белком SEQ ID NO: 1 и ингибитором иммунных контрольных точек также рассматриваются для использования в качестве дополнительной комбинированной терапии для лечения рака. Другие схемы противоракового лечения включают другие терапевтические иммунотерапии, такие как схемы адоптивного переноса клеток, антиген-специфическая вакцинация, ингибирование белков репарации ДНК (например, ингибиторы нуклеинового фермента поли(аденозин-5'-дифосфорибоза)полимеразы [«поли(АДФ-рибоза)полимеразы», ингибиторы PARP») и комбинации с более чем одной молекулой ингибитора иммунных контрольных точек.

Способы по изобретению могут быть дополнительно объединены с другими терапевтическими агентами и/или противораковыми агентами. Предпочтительно, терапевтический агент и/или противораковый агент представляет собой антитело. Предпочтительно, терапевтический агент представляет собой терапевтический белок. Предпочтительно, терапевтический агент представляет собой малую молекулу. Предпочтительно, противораковый агент представляет собой антиген. Предпочтительно, терапевтический агент представляет собой популяцию клеток. Предпочтительно, терапевтический агент представляет собой терапевтическое антитело. Предпочтительно, терапевтический агент представляет собой другое цитотоксический и/или химиотерапевтический агент. Термин «цитотоксический агент» в настоящем документе относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Химиотерапевтический агент включает химические соединения, применимые при лечении рака.

В любой такой дополнительной комбинированной терапии, различные дополнительные терапевтические агенты часто имеют другие механизмы действия, чем слитый белок SEQ ID NO: 1 и/или ингибитор(ы) иммунных контрольных точек. Такая дополнительная комбинированная терапия может быть особенно полезной, позволяя дальнейшее снижение дозы одного или нескольких агентов, тем самым уменьшая или устраняя побочные эффекты, связанные с одним или несколькими агентами; кроме того, такая дополнительная комбинированная терапия может оказывать синергетическое терапевтическое или профилактическое действие на основное заболевание, нарушение или состояние.

Предпочтительно, каждый из слитых белков SEQ ID NO: 1, ингибиторов иммунных контрольных точек и дополнительных терапевтических агентов может быть в отдельных дозированных формах или комбинированных дозированных формах. Предпочтительно, слитый белок SEQ ID NO: 1, ингибиторы иммунных контрольных точек и дополнительные средства (например, химиотерапевтический агент) вводят или применяют последовательно. Однако, одно или несколько терапевтических средств можно вводить одновременно, в то время как одно или несколько вводят последовательно,

Независимо от того, вводят ли слитый белок SEQ ID NO: 1, ингибиторы иммунных контрольных точек и дополнительные терапевтические средства последовательно, одновременно или в любой их вариации, они считаются вводимыми в качестве дополнительной комбинированной терапии. для целей настоящего описания.

Предпочтительна любая возможная схема дозирования для дополнительной комбинированной терапии, которая может быть приемлемой, подходящей или оптимальной в данных обстоятельствах. Схемы, описанные ниже, являются типовыми, а не исключительными. Предпочтительно, лечение слитым белком SEQ ID NO: 1, ингибиторами иммунных контрольных точек и дополнительным терапевтическим агентом сохраняется в течение определенного периода времени. Предпочтительно, лечение слитым белком SEQ ID NO: 1, ингибиторами иммунных контрольных точек и дополнительным терапевтическим агентом сокращается или продолжается в течение определенного периода времени (например, когда субъект стабилен). Предпочтительно, лечение дополнительными терапевтическими агентами сокращается или прекращается (например, когда субъект стабилен), в то время как лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 и ингибиторами иммунных контрольных точек сохраняется при постоянной схеме дозирования. Предпочтительно, лечение дополнительными агентами снижается или прекращается (например, когда субъект стабилен), лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 снижается (например, более низкая доза, менее частый прием или более короткая схема лечения), и лечение ингибитором иммунных контрольных точек сохраняется при постоянной схеме дозирования. Предпочтительно, лечение дополнительными агентами снижается или прекращается (например, когда субъект стабилен), лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 снижается (например, более низкая доза, менее частый прием или более короткая схема лечения), и лечение ингибитором иммунных контрольных точек сохраняется при постоянной схеме дозирования. Предпочтительно, лечение дополнительными терапевтическими агентами и слитым белком SEQ ID NO: 1 сохраняется при постоянной схеме дозирования, в то время как лечение ингибитором иммунных контрольных точек снижается или прекращается (например, когда субъект стабилен). Предпочтительно, лечение дополнительными терапевтическими агентами и ингибитором иммунных контрольных точек сохраняется при постоянной схеме дозирования, в то время как лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 уменьшается или прекращается (например, более низкая доза, менее частое введение или более короткая схема лечения). Идентификация и использование других схем дозирования будет очевидным для специалиста в данной области техники.

Настоящее изобретение представляет применение дополнительных терапевтических агентов (например, химиотерапевтических агентов) для лечения и/или профилактики рака, опухоли или предраковых или связанных с раком заболеваний, нарушений или состояний. Примеры химиотерапевтических агентов включают, но не ограничены ими, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие

как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, каминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомиуины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; пополнители фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2′,2″-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платина и координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT11; ингибиторы топоизомеразы; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

Химиотерапевтические агенты также включают антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, онапристон и

торемифен; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Предпочтительно, комбинированная терапия включает введение гормона или родственного гормонального агента.

Любой другой агент, пригодный для лечения или профилактики раковых состояний, описанных в настоящем документе, рассматривается в качестве дополнительного агента, включая, но не ограничиваясь этим, цитокин, такой как IL-2, или антагонист цитокина, такой как IL-12, INFα или рецептор анти-эпидермального фактора роста, радиационную терапию, моноклональное антитело против другого опухолевого антигена, комплекс моноклонального антитела и токсина, Т-клеточный адъювант, трансплантат костного мозга или антигенпрезентирующие клетки (например, терапию дендритными клетками). Также в настоящем документе представлены вакцины (например, в виде растворимого белка или в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей белок).

Рекомбинантное продуцирование

Предпочтительно, слитый белок SEQ ID NO: 1 получают с использованием рекомбинантных методов. Слитый белок можно получать в виде внутриклеточного белка или в виде секретируемого белка с использованием любой подходящей конструкции и любой подходящей клетки-хозяина, которая может быть прокариотической или эукариотической клеткой, такой как бактериальная (например, E. coli) или дрожжевая клетка-хозяин, соответственно. Другие примеры эукариотических клеток, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, включают клетки насекомых, клетки млекопитающих и/или растительные клетки. Если используют клетки-хозяева млекопитающих, они могут включать клетки человека (например, клетки HeLa, 293, H9 и Jurkat), клетки мыши (например, клетки NIH3T3, L-клетки и C127 клетки), клетки приматов (например, Cos 1, Cos 7 и CV1) и клетки хомяка (например, клетки яичника китайского хомяка (CHO)).

Различные системы хозяин-вектор, подходящие для экспрессии полипептида, могут быть использованы в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; и Ausubel et al., (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons. Способы введения генетического материала в клетки-хозяева включают, например, трансформацию, электропорацию, конъюгацию, кальций-фосфатные способы и подобные. Способ переноса может быть выбран таким образом, чтобы обеспечить стабильную экспрессию введенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, может быть предоставлена в виде наследуемого эписомального элемента (например, плазмиды) или может быть геномно интегрирована. Множество подходящих векторов для использования в продуцировании представляющего интерес полипептида имеются в продаже.

Векторы могут обеспечивать внехромосомное сохранение в клетке-хозяине или могут обеспечивать интеграцию в геном клетки-хозяина. Вектор экспрессии обеспечивает транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности, и могут обеспечивать индуцибельную или конститутивную экспрессию, где кодирующая область функционально связана под транскрипционным контролем области транскрипционной инициации, области терминации транскрипции и трансляции. Как правило, транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности могут включать, но не ограничены ими, последовательности промоторов, сайты связывания рибосом, последовательности начала и остановки транскрипции, последовательности начала и остановки трансляции и последовательности энхансера или активатора. Промоторы могут быть либо конститутивными, либо индуцируемыми, и могут представлять собой сильный конститутивный промотор (например, T7).

Конструкции экспрессии обычно имеют удобные сайты рестрикции, расположенные рядом с последовательностью промотора, чтобы обеспечить вставку последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих представляющие интерес белки. Селективный маркер, действующий в хозяине экспрессии, может присутствовать для облегчения селекции клеток, содержащих вектор. Более того, конструкция экспрессии может включать дополнительные элементы. Например, вектор экспрессии может иметь одну или две системы репликации, что позволяет сохранять его в организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых, для экспрессии, и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации. Кроме того, конструкция экспрессии может содержать селективный маркерный ген, позволяющий осуществлять селекцию трансформированных клеток-хозяев. Селективные гены хорошо известны в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

Выделение и очистку белка можно осуществить в соответствии со способами, известными в данной области техники. Например, белок можно выделить из лизата клеток, генетически модифицированных для экспрессии белка конститутивно и/или при индукции, или из синтетической реакционной смеси путем иммуноаффинной очистки, которая обычно включает контакт образца с анти-белковым антителом, промывание для удаления не специфически связанного материала и элюирование специфически связанного белка. Выделенный белок может быть дополнительно очищен диализом и другими способами, обычно используемыми для очистки белка. В одном варианте осуществления, белок может быть выделен с использованием методов металлохелатной хроматографии. Белки могут содержать модификации для облегчения выделения.

Слитый белок SEQ ID NO: 1 может быть получен в по существу чистой или выделенной форме (например, свободной от других полипептидов). Полипептиды могут присутствовать в композиции, обогащенной полипептидом по сравнению с другими компонентами, которые могут присутствовать (например, другими полипептидами или другими компонентами клетки-хозяина). Например, очищенный слитый белок может быть представлен таким образом, что слитый белок присутствует в композиции, которая по

существу не содержит других экспрессируемых белков, например, менее примерно 90%, менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20%, менее примерно 10%, менее примерно 5% или менее примерно 1%.

Предпочтительно, слитый белок с SEQ ID NO: 1 может быть получен с использованием биологической рекомбинантной системы экспрессии, обычно включающей трансфекцию клеток ДНК вектором, который содержит генетическую матрицу, кодирующую слитый белок с SEQ ID NO: 1, и последующее культивирование клеток таким образом, чтобы они транскрибировали и транслировали слитый белок. Обычно клетки затем лизируют, чтобы извлечь экспрессированный белок для последующей очистки. Для использования подходят как прокариотические, так и эукариотические системы экспрессии белка in vivo. Предпочтительно, слитый белок SEQ ID NO: 1 продуцируется в клетках CHO.

Наборы

Также представлены наборы, содержащие слитый белок SEQ ID NO: 1, приготовленный для введения, и необязательно любой другой химиотерапевтический или противораковый агент. Наборы обычно имеют форму физической структуры, содержащей различные компоненты, как описано ниже, и могут быть использованы, например, при осуществлении способов, описанных выше. Набор может включать слитый белок SEQ ID NO: 1 (поставляемый, например, в стерильном контейнере), который может быть в форме фармацевтической композиции, подходящей для введения субъекту.

Фармацевтическая композиция может быть представлена в форме, готовой к применению, или в форме, требующей, например, восстановления или разбавления перед введением. Когда композиции находятся в форме, которая нуждается в восстановлении пользователем, набор также может включать буферы, фармацевтически приемлемые эксципиенты и подобные, упакованные вместе или отдельно от слитого белка SEQ ID NO: 1. При рассмотрении комбинированной терапии (например, слитый белок SEQ ID NO: 1 и ингибиторы контрольной точки), набор может содержать несколько агентов по отдельности, или они уже могут быть объединены в наборе. Аналогично, когда требуется дополнительная комплементарная терапия (например, слитый белок SEQ ID NO: 1, ингибиторы иммунных контрольных точек и дополнительная комплементарная терапия или агент), набор может содержать несколько агентов по отдельности, или два или несколько из них уже могут быть объединены в наборе.

Набор по изобретению может быть разработан для условий, необходимых для надлежащего сохранения компонентов, находящихся в нем (например, при охлаждении или замораживании). Набор может содержать этикетку или вкладыш в упаковку, включающий идентифицирующую информацию о находящихся в нем компонентах и инструкции по их применению (например, параметры дозирования, клиническую фармакологию активного ингредиента, включая механизм действия, фармакокинетику и фармакодинамику, побочные эффекты, противопоказания и т.д.).

Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, и все

различные контейнеры могут находиться в одной упаковке. Этикетки или вкладыши могут содержать информацию о производителе, такую как номера партий и даты истечения срока годности. Этикетка или вкладыш в упаковку могут быть, например, интегрированы в физическую структуру, содержащую компоненты, содержаться отдельно в физической структуре или прикреплены к компоненту набора (например, ампуле, шприцу или флакону).

Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать или быть включены в машиночитаемый носитель, такой как диск (например, жесткий диск, карту, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитную ленту или электрический носитель данных, такой как RAM и ROM, или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители данных, FLASH-носитель или карты памяти. В некоторых вариантах осуществления, действительные инструкции не присутствуют в наборе, но представлены средства для получения инструкций из удаленного источника, например, через интернет-сайт.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены в качестве иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие заявленное изобретение каким-либо образом.

Пример 1. Дизайн исследования ION STUDY

Таблица 2: Список сокращений и определения условий

Сокращение или термин	**Полная форма определения**
ACTH	Адренокортикотропный гормон
ADA	Антитела к лекарственному средству
AE	Неблагоприятное явление
ALK-P	Щелочная фосфатаза
ALT	Аланинаминотрансфераза
ANC	Абсолютное количество нейтрофилов
aPTT	Активированное частичное тромбопластиновое время
AST	Аспартатаминотрансфераза
BCG	Бацилла Кальметта-Герена
BUN	концентрация азота мочевины в крови
C	Цикл
CBC	Развернутый анализ крови
CI	Доверительный интервал
CIML	Центральная лаборатория иммунного мониторинга
CNS	Центральная нервная система
CO2	Углекислый газ
CR	Полный ответ/ремиссия

CrCl	Клиренс креатинина
CRO	Контрактная исследовательская организация
CSA	Соглашение о клиническом исследовании
КТ	Компьютерная томография
CTCAE	Общие терминологические критерии нежелательных явлений
D	День
DKA	Диабетический кетоацидоз
DLT	Дозолимитирующая токсичность
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DOR	Продолжительность ответа
D/C	Прекращение
ЭКГ	Электрокардиограмма
Сокращение или термин	**Полная форма определения**
ECI	События, представляющие клинический интерес
ECOG	Восточная объединенная онкологическая группа
eCRF	Электронная форма истории болезни
EDC	Электронный сбор данных
ELISA	Иммуноферментный анализ
EOT	Конец лечения
ФДГ	Фтордезоксиглюкоза
FHCRC	Центр исследования рака Фреда Хатчинсона
FIH	Впервые на человеке
FNA	Пункционная биопсия
FU	Отслеживание
GCP	Надлежащая клиническая практика
GFR	Скорость клубочковой фильтрации
GI	Желудочно-кишечный
GMP	Надлежащая производственная практика
HBsAg	Поверхностный антиген гепатита В
hCG	Хорионический гонадотропин человека
HCV	Вирус гепатита С
HIV	Вирус иммунодефицита человека
HNSCC	Плоскоклеточная карцинома головы и шеи

HPV	Вирус папилломы человека
hsTCRB	Бета-цепь Т-клеточного рецептора человека
IB	Брошюра исследователя
ICF	Форма информированного согласия
ICH	Международный совет по гармонизации
ID	Идентификация
IEC	Независимый комитет по этике
IFN	интерферон
IHC	Иммуногистохимия
IL	Интерлейкин
IL-2R	Рецептор интерлейкина-2
Сокращение или термин	**Полная форма определения**
INR	Международное нормализованное отношение
ION	Иммунная онкологическая сеть
irAE	Нежелательное явление, связанное с иммунитетом
IRB	Экспертный совет медицинского учреждения
irRC	Иммунозависимые критерии ответа
IUD	Внутриматочная спираль
IV	Внутривенная, внутривенно
Kyn	Кинуренин
LDH	Лактатдегидрогеназа
MedDRA	Медицинский словарь терминологии регулятивной деятельности
MFI	Средняя интенсивность флуоресценции
MRI	Магнитно-резонансная томография
NCCN	Национальная комплексная онкологическая сеть
NCI	Национальный институт рака
NK	Натуральный киллер
NSAID	Нестероидный противовоспалительный препарат
NSCLC	Немелкоклеточный рак легкого
ORR	Суммарная эффективность терапии
OS	Общая выживаемость
PBMC	Мононуклеарная клетка периферической крови
PCR	Полимеразная цепная реакция

PD	Прогрессирующее заболевание
PD-1	Белок-1 запрограммированной смерти клетки
PD-L1	Лиганд-1 запрограммированной смерти клетки
PET	Позитронно-эмиссионная томография
PFS	Выживаемость без прогрессирования
PI	Главный исследователь
PR	Частичный ответ/ремиссия
PT	Протромбиновое время
Q2W	Каждые 2 недели
Q3W	Каждые 3 недели
Сокращение или термин	**Полная форма определения**
R	Рецептор
RECIST	Критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении
РНК	Рибонуклеиновая кислота
рРНК	Рибосомальная рибонуклеиновая кислота
SAE	Серьезное нежелательное явление
SAP	План статистического анализа
SD	Стабильное заболевание
SOP	Стандартные операционные процедуры
SRC	Комитет по проверке безопасности
T1DM	Сахарный диабет 1 типа
TB	Туберкулез
TCR	Т-клеточный рецептор
TCRB	Бета-цепь Т-клеточного рецептора
TEAE	Нежелательное явление, возникающее при лечении
TIL	Опухолеинфильтрирующие лимфоциты
TMB	Мутационная нагрузка опухоли
TME	Микроокружение опухоли
Treg	Регуляторная Т-клетка
Trp	Триптофан
TSH	Тиреотропный гормон
TTP	Время до прогрессирования
ULN	Верхний предел нормы
US	Соединенные Штаты

USP-NF	Фармакопея США - Национальный формуляр
WGS	Полный шот-ган генома
WHO-ATC	Всемирная организация здравоохранения - Анатомо-терапевтически-химическая (система классификации лекарственных средств)

Сущность:

Это многоцентровое клиническое исследование фазы 2 предназначено для оценки частоты ответа на слитый белок SEQ ID NO: 1 в комбинации с анти-PD-1 терапией KEYTRUDA® (пембролизумаб) у пациентов с прогрессирующей или рецидивирующей плоскоклеточной карциномой головы и шеи, у которых не был достигнут полный ответ на лечение анти-PD-(L)1 антителом. Вторичные цели включают оценку продолжительности ответа, выживаемости без прогрессирования, времени до прогрессирования и общей выживаемости пациентов с прогрессирующей или рецидивирующей плоскоклеточной карциномой головы и шеи, получающих лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 в комбинации с пембролизумабом. В качестве исследовательской цели, это клиническое исследование будет оценивать микроокружение опухоли с использованием парных биопсий опухоли для оценки потенциальных прогностических биомаркеров ответа на добавление слитого белка SEQ ID NO: 1.

Цели:

Первичные:

• Для оценки частоты ответа на слитый белок SEQ ID NO: 1 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC), которые ранее получали терапию против белка 1 запрограммированной смерти клеток (анти-PD-1) или против лиганда-1 запрограммированной смерти клеток (анти-PD-L1) (далее именуемый PD-[L]1), но не достигший полной ремиссии (CR). Основная цель будет оцениваться для следующих 2 групп:

- Группа 1: Пациенты со стабильным заболеванием (SD), определяемым как ≥12 недель SD согласно критериям оценки объективного ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1, или пациенты с частичным ответом (PR) без дальнейшего уменьшения размера опухоли или ответа (т. е. PR и отсутствие дальнейшего улучшения) в течение ≥8 недель при предшествующем приеме анти-PD-(L)1 терапии;

- Группа 2: пациенты с прогрессирующим заболеванием (PD) без предварительного ответа на анти-PD-(L)1 терапию через ≥8 недель анти-PD-1 терапии, или пациенты с PD в настоящее время после предварительного достижения наилучшего ответа SD или PR и через ≥8 недель на анти-PD-(L)1 терапии.

Вторичные:

• Оценка продолжительности ответа (DOR), выживаемости без прогрессирования (PFS), времени до прогрессирования (TTP) и общей выживаемости (OS) пациентов с распространенной или рецидивирующей HNSCC, получающих пембролизумаб плюс

слитый белок SEQ ID NO: 1;

• Оценка безопасности и переносимости пембролизумаба плюс слитый белок SEQ ID NO: 1.

Исследовательские:

• Оценка того, может ли оценка биопсий пациентов до лечения, у которых не удалось достичь полного ответа на анти-PD-(L)1 терапии, выявить подгруппу пациентов, которые, вероятно, ответят на добавление слитого белка SEQ ID NO: 1;

• Оценка того, может ли вторая биопсия, взятая во время комбинированной терапии, идентифицировать изменения в опухолях, которые будут прогнозировать ответ или отсутствие ответа на добавление слитого белка SEQ ID NO: 1.

Методология: Это многоцентровое открытое терапевтическое исследование фазы 2 для оценки противоопухолевой эффективности SEQ ID NO: 1 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с распространенной, рецидивирующей и/или метастатической HNSCC при лечении анти-PD-(L)1-антителом без достижения CR.

Исследуемый продукт, дозировка, продолжительность и способ введения: Лекарственный продукт слитого белка SEQ ID NO: 1 представляет собой стерильный лиофилизированный порошок от белого до беловатого цвета для ВВ инфузии. Каждый флакон для однократного применения содержит 2,28 мг для доставки 2 мг слитого белка SEQ ID NO: 1. При восстановлении в соответствии с указаниями, каждый мл содержит 1 мг слитого белка SEQ ID NO: 1 в виде прозрачного бесцветного раствора. Эксципиенты, включенные в состав слитого белка SEQ ID NO: 1, представляет собой моногидрат лимонной кислоты, Фармакопеи США - Национального формуляра (USP-NF), трехосновный дигидрат цитрата натрия, USP-NF, сахарозу, USP-NF, и полисорбат 20, USP-NF. Лекарственный продукт слитого белка SEQ ID NO: 1 должен храниться и охлаждаться при температуре от 2°C до 8°C (от 36°F до 46°F). Лекарственный продукт слитого белка SEQ ID NO: 1 поставляется со стерильной водой для инъекций, USP для восстановления лиофилизированного материала. Разбавитель, содержащий полисорбат 20, поставляется отдельно для использования. Восстановленный слитый белок SEQ ID NO: 1 вводят 30-минутной ВВ инфузией один раз в сутки в течение 5 дней подряд в течение первой недели каждого цикла лечения.

Слитый белок SEQ ID NO: 1 следует вводить в виде инфузии, начинающейся через 60-90 минут после завершения инфузии пембролизумаба. Пембролизумаб следует вводить в виде ВВ инфузии в течение 30 минут в дозе 200 мг Q3W, в течение до 1 года до тех пор, пока пациенты получают клиническую пользу (т. е. объективный ответ или SD) и хорошо переносят терапию.

Продолжительность исследования: это исследование состоит из 28-дневного периода скрининга, периода лечения и 30-дневного наблюдения после лечения. Период лечения состоит, по меньшей мере, из пяти 3-недельных циклов, которые могут повторяться до 1 года скрининга.

Статистические методы: для всех применимых параметров будет представлена

описательная статистика.

Эффективность: ответ на лечение будет оцениваться с использованием как критериев оценки ответа при солидных опухолях версии 1.1 (RECIST 1.1), так и критериев оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей (Irecist). Для пациентов с объективно измеримым заболеванием будет рассчитан ответ на терапию, DOR, PFS и OS.

Первичная конечная точка эффективности будет оцениваться в популяции, подлежащей оценке эффективности (все пациенты, получившие, по меньшей мере, 1 дозу обоих исследуемых препаратов) для каждой группы отдельно и в целом. Частота объективного улучшения после продолжительной анти-PD-1 терапии слитым белком SEQ ID NO: 1 будет суммирована по группам (группа 1 и группа 2) и общей популяции с описательной статистикой. Анализ объективного ответа с использованием точного биномиального теста будет проводиться отдельно для каждой группы и в целом; будет указан 95% доверительный интервал.

Вторичные конечные точки эффективности будут оцениваться в популяции, подлежащей оценке эффективности (группа 1 и группа 2).

DOR и TTP будут рассчитываться и суммироваться по группам и в целом. Кривые PFS и OS будут построены по группам и в целом с использованием подхода Каплана-Мейера (KM). Будет указано среднее время выживания (если применимо) и его 95% CI для PFS и OS. Частота PFS и OS через 6 и 12 месяцев будут оцениваться с использованием подхода KM.

Частота объективного ответа будет суммирована для каждой из 4 когорт.

Доля изменения поражений-мишеней по сравнению с исходным уровнем будет суммироваться по группам и в целом.

Обоснование исследования

Хотя клинические исследования ниволумаба и пембролизумаба продемонстрировали противоопухолевую активность и установили эффективность, активность и преимущества анти-PD-1 терапии у пациентов с рецидивирующей метастатической HNSCC, получавших препараты платины, показатели ответа остаются низкими, и количество пациентов, имеющих рецидивы или неспособность достичь CR, остается в подавляющем большинстве случаев 85% и более. Поскольку пациенты с HNSCC страдают значительной заболеваемостью и смертностью от этого заболевания, и эффективность любой монохимиотерапии остается низкой при отсутствии проверенных вариантов спасения в этой популяции, которая потерпела неудачу при анти-PD-1 терапии, существует исключительно высокая неудовлетворенная потребность в открытии новых методов лечения или эффективной комбинированной иммунотерапии для усиления, улучшения или восстановления ответа на анти-PD-1 терапию.

В это исследование будут включены пациенты, которые ранее получали терапию анти-PD-1 антителами (пембролизумабом или ниволумабом) в качестве последнего лечения, или пациенты, получающие текущую терапию анти-PD-1 антителами, но не достигшие CR. Ингибиторы белка-1 запрограммированной смерти клеток:лиганда-1

запрограммированной смерти клеток (PD-L1) (далее именуемые PD-[L]1) эффективны в небольших подмножествах практически всех гистологических типов рака, однако у большинства пациентов, получающих лечение, польза не получена. Кроме того, большинство опухолей, которые отвечают, в конечном итоге рецидивируют. Поэтому, весьма вероятно, что в ближайшем будущем пациенты со стабильным заболеванием (SD) или с прогрессированием на анти-PD-(L)1 терапии, вероятно, будут крупнейшей отдельной категорией пациентов в США. В долгосрочном последующем анализе KEYNOTE-012 исследования монотерапии пембролизумабом, проведенном у 192 пациентов с HNSCC, частота объективного ответа составила 18% (95% CI, 13-24%) (Mehra et al, 2018, Br. J. Cancer. 119(2):153-159). Среди подмножества пациентов, достигших ответа, среднее время до наилучшего ответа составило 2 месяца (диапазон от 2 до 17 месяцев). Таким образом, после периода 8 недель монотерапии пембролизумабом, приблизительно 9% исходной популяции, или приблизительно 10% оставшейся популяции, которые еще не ответили, будут ожидать появления нового ответа при продолжении монотерапии пембролизумабом. Если слитый белок SEQ ID NO: 1 может усиливать ответы по сравнению с ответом на против PD-(L)1 монотерапию, это будет способствовать дальнейшей разработке стратегий с использованием комбинации слитого белка SEQ ID NO: 1 плюс блокады иммунных контрольных точек в качестве комбинированной иммунотерапии первой линии для HNSCC и других злокачественных новообразований.

Важно распознать характер опухолей у пациентов, у которых не достигается полная регрессия PD-(L)1 с помощью анти-PD1 или анти-PD-L. Таким образом, будет обязательна биопсия перед лечением. В настоящее время, опухолями, с большей вероятностью отвечающими на анти-PD-1, являются опухоли с повышенным числом мутаций и, следовательно, аномальными белками, содержащими потенциально иммуногенные эпитопы, и с инфильтрацией Т-клеток, способных распознавать аномальные белки. Механизмы, через которые опухоли терпят неудачу при ответе на анти-PD-1, еще не определены полностью, но включает недостаточное количество инфильтрированных CD8+ Т-клеток, отсутствие индукции PD-L1 интерфероном (IFN)-γ, секретируемым из инфильтрирующих CD8+ Т-клеток, отсутствие ответа опухоли на цитотоксические молекулы, недостаточность апоптоза, наличие супрессивных клеток и в микроокружении опухоли (TME), и механические барьеры, опосредованные сосудистыми или стромальными факторами. Вероятно, будет гораздо больше избыточных и не избыточных механизмов отказа. По-видимому, некоторые механизмы отказа будут восстановлены с помощью слитого белка SEQ ID NO: 1 (например, рекрутирование CD8+ Т-клеток в TME), а некоторые нет.

Хотя в настоящее время невозможно выдвинуть гипотезу о частоте или доле каждого механизма, мы считаем, что биопсии участников до и во время терапии дадут представление о предполагаемых механизмах отказа или успеха для создания гипотез, которые лягут в основу дизайна будущего исследования.

Оценка того, может ли добавление слитого белка SEQ ID NO: 1 вызывать ремиссию у пациентов с опухолями, которые не отвечают на анти-PD-1 лечение, является основной целью исследования. Понимание того, изменяет ли слитый белок SEQ ID NO: 1 количество NK клеток и Т-клеток в опухолях, также имеет решающее значение. Таким образом, биопсия после лечения (вторая) будет собрана в течение 2 недели (цикл [C] 1, день [D] 12 или в любое время от C1D8 до C1D19).

Исследуемая популяция включает пациентов с прогрессирующей или рецидивирующей HNSCC, которые либо рефрактерны, либо прогрессируют на предыдущей анти-PD-(L)1 терапии, или у которых не было ответа или регрессии опухоли при анти-PD-1 терапии в течение более 8 недель до получения слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с пембролизумабом. Пациенты в этой популяции следующие:

Группа 1 (когорты 1 и 2) будет состоять из всех пациентов с текущим SD (в течение не менее 12 недель) или частичным ответом (PR) без дальнейшего уменьшения размера опухоли или ответа в течение ≥8 недель (т. е. PR без дальнейшего улучшения).

Группа 2 (когорты 3 и 4) будет состоять из пациентов с прогрессирующим заболеванием (PD) без предшествующего ответа на анти-PD-(L)1 терапию через ≥8 недель на анти-PD-(L)1 или текущее PD после предыдущего достижения наилучшего ответа SD или PR и через ≥8 недель на анти-PD-(L)1 терапии.

HNSCC выбирают в качестве типового рака из-за высокой неудовлетворенной потребности в этой трудно поддающейся лечению популяции пациентов без эффективных терапевтических вариантов по ряду причин: 1) продемонстрированная эффективность и недавнее одобрение пембролизумаба для лечения рецидивирующей или метастатической HNSCC, 2) легкость серийных биопсий в легкодоступных участках опухоли у части пациентов, и 3) ответы на комбинацию слитого белка SEQ ID NO: 1 и пембролизумаба, которые легко и просто поддаются оценке. Однако, если будет наблюдаться эффективность или ответ, комбинация может быть протестирована при многих различных видах рака.

Это исследование будет проводиться в сотрудничестве с Иммунной онкологической сетью (ION), которая будет осуществлять деятельность, связанную с, но не ограниченную ими, надзором и управлением клиническими учреждениями, медицинским мониторингом и услугами лабораторного анализа.

Выбор дозы

Пембролизумаб

Доза пембролизумаба 200 мг каждые 3 недели является одобренной дозой для лечения пациентов с HNSCC (Keytruda USPI).

Слитый белок SEQ ID NO: 1

Всем пациентам в этом исследовании будет даваться слитый белок SEQ ID NO: 1 в суточной дозе 3 мкг/кг в течение 5 дней подряд в дни 1-5 первой недели каждого 3-недельного цикла лечения.

Было начато и в настоящее время продолжается первое клиническое исследование

на людях (FIH) слитого белка SEQ ID NO: 1. Это исследование проводится у пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях, которые рефрактерны или не переносят терапии, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу. Пациентам вводят SEQ ID NO: 1 путем 30-минутной внутривенной (ВВ) инфузии ежедневно в течение 5 дней с последующим периодом без лечения в повторяющихся циклах.

Дозирование повторяют каждый 21 день, за исключением первого цикла лечения, который составляет 14 дней. Промежуточные данные участников исследования, получавших от 0,1 до 3,0 мкг/кг/сутки слитого белка SEQ ID NO: 1 в исследовании FIH, показали, что дозо-пропорциональное увеличение системного воздействия слитого белка SEQ ID NO: 1 и дозозависимое увеличение циркулирующих NK клеток и $CD8^+$ Т-клеток с минимальным и не дозозависящим эффектом на T_{reg}. При уровне дозе 3 мкг/кг (n=8), по одному случаю фебрильной нейтропении 3-й степени и гипоальбуминемии 3-й степени соответствуют определениям протокола для дозолимитирующей токсичности (DLT). Определения DLT впоследствии были изменены, чтобы ослабить критерии DLT и разрешить дальнейшее повышение дозы.

Комбинация ожидаемых фармакодинамических эффектов и благоприятной переносимости 3 мкг/кг слитого белка SEQ ID NO: 1 поддерживает оценку этой дозы в комбинированной терапии.

Общий дизайн исследования и план

В исследовании будет оцениваться противоопухолевая эффективность слитого белка SEQ ID NO: 1 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с распространенной, рецидивирующей и/или HNSCC на лечении анти-PD-(L)1 антителом (пембролизумабом или ниволумабом), не достигших CR.

Исследование представляет собой многоцентровое открытое терапевтическое исследование фазы 2 в сотрудничестве с ION. Пациенты должны получать анти-PD-(L)1 терапию до включения в исследование. После включения в исследование, слитый белок SEQ ID NO: 1 с пембролизумабом будут вводить 4 когортам пациентов с распространенной, рецидивирующей и/или метастатической HNSCC, которые получали анти-PD-(L)1 терапию, чей текущий ответ выглядит следующим образом:

• Когорта 1: SD, определенное как ≥12 недель SD согласно критериям RECIST;

• Когорта 2: PR без дальнейшего уменьшения размера опухоли или ответа в течение ≥8 недель (т. е. PR без улучшения в дальнейшем);

• Когорта 3: PD без предыдущего ответа на анти-PD-(L)1 терапию через ≥8 недель на анти-PD-(L)1, или

• Когорта 4: Текущий PD после предыдущего достижения наилучшего ответа SD или PR и после ≥8 недель анти-PD-(L)1 терапии.

Пациентам будут вводить комбинацию слитого белка SEQ ID NO: 1 и пембролизумаба. Для упрощения 4 когорты пациентов будут объединены в 2 группы:

• Группа 1 будет состоять из всех пациентов с текущим SD или PR (когорты 1 и 2), которые не прогрессируют или демонстрируют дальнейшее уменьшение размера опухоли.

• Группа 2 будет состоять из пациентов с PD (когорты 3 и 4).

Биопсия опухоли на исходном уровне потребуется во время включения в исследование после завершения процедур скрининга и до первого применения комбинированной схемы для оценки характеристик опухоли каждого пациента с целью выявления пациентов с опухолями, которые могут иметь ограниченную эффективность пембролизумаба или потенциальный ответ на комбинацию анти-PD-1/слитый белок SEQ ID NO: 1. Опухоли оценивают по количеству и характеру инфильтрирующих опухоль Т-клеток и других лейкоцитов, и для количественной оценки экспрессии PD-L1, сигнатуры генов, которые коррелируют с ответом или отсутствием ответа и будут секвенированы для определения количества не синонимичных генных мутаций, которые могут служить Т-клеточными мишенями.

Пациенты также будут проходить биопсию после лечения (вторую) в C1D12 или в любое время с C1D8 по C1D19, чтобы оценить, изменяет ли TME добавление слитого белка SEQ ID NO: 1 в схему лечения, и какие изменения на терапии (иммунофармакодинамика) предрасполагают к ответам на комбинацию.

В исследование планируется включить 19 и 12 поддающихся оценке пациентов для групп 1 и 2, соответственно. Количество пациентов, зачисленных в каждую когорту в каждой группе, будет определяться во время зачисления на основе ответа пациента на предыдущее лечение. Существует возможность расширения конкретной интересующей когорты максимум до 50 пациентов в группе.

Пембролизумаб будет вводиться в соответствии со стандартной схемой 200 мг фиксированная доза BB Q3W. Слитый белок SEQ ID NO: 1 будет вводиться BB в суточной дозе 3 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней подряд с 1 по 5 дни первой недели каждого 3-недельного цикла лечения.

Слитый белок SEQ ID NO: 1 может быть продолжен до тех пор, пока не разовьется токсичность. Если возникает токсичность, связанная с слитым белком SEQ ID NO: 1, дозирование как пембролизумаба, так и слитого белка SEQ ID NO: 1 будет приостановлено. После восстановления от НЯ, которое соответствует критериям приостановки дозы, пациент может возобновить прием полной дозы пембролизумаба и полной или уменьшенной дозы слитого белка SEQ ID NO: 1 в последующих циклах после консультации с медицинским наблюдателем, или может выйти из исследования. Пембролизумаб будет продолжаться Q3W до подтверждения критериев прекращения; изменение дозы пембролизумаба не допускается. Снижение дозы слитого белка SEQ ID NO: 1 с 3 мкг/кг/день до 1 мкг/ кг/день может разрешено.

Пациенты с опухолями, которые отвечают на лечение, будут продолжать лечение до следующего:

• Имеет место подтвержденное прогрессирование (по согласованию с медицинскими наблюдателями ION и Alkermes, пациентам, переносящим терапию и получающим клиническую пользу, может быть позволено остаться в исследовании в течение до 1 года);

• До возникновения неприемлемой токсичности;

• Возникают другие критерии прекращения.

Безопасность и переносимость будут оцениваться и сообщаться с использованием Общих терминологических критериев нежелательных явлений (CTCAE) версии 5.0. Безопасность будет контролироваться Главным исследователем (PI) исследования, PI участвующего медицинского центра, PI Координационного центра ION и персоналом, а также представителями от Alkermes. Подробная информация, касающаяся Комитета по проверке безопасности (SRC), включая участников, периодичность совещаний и критерии, по которым будут проводиться внеочередные совещания, описаны в Уставе SRC.

Если наблюдаемые неприемлемые НЯ являются типичными для известной токсичности пембролизумаба и/или слитого белка SEQ ID NO: 1, будет рассмотрено следующее: (1) пересмотр критериев предоставления протокола для снижения вероятности токсичности, (2) изменение дозы или схемы, или (3) разрешение проведения исследования в соответствии с планом, предполагая, что пациенты в этом исследовании будут иметь смертельные заболевания и несколько других вариантов лечения. В этой ситуации необходимо будет оценить соотношение риск/польза.

Если считается, что неожиданные, неприемлемые НЯ связаны с одновременным введением слитого белка SEQ ID NO: 1 и пембролизумаба, PI, PI участвующих медицинских центров, PI Координационного центра ION и сотрудники, а также представители Alkermes рассмотрят возможность пересмотра критериев предоставления протокола для снижения вероятности токсичности или могут рассмотреть возможность проведения исследования в соответствии с планом, учитывая соотношение риск/польза для этой популяции.

Схемы дизайна исследования представлены на фигуре 2 и фигуре 3.

Визуализация опухоли и оценка заболевания

Для целей этого исследования, исходное сканирование должно быть выполнено в течение 28 дней до начала лечения. В дополнение к исходному сканированию, первая временная точка визуализации во время исследования будет проводиться через 6 недель (±7 дней) после первой дозы, затем в течение 7 дней до каждого второго цикла после этого, или чаще, если это будет клинически показано, пока пациент находится в исследовании.

Пациенты, чей ответ преобразуется из PD или SD в PR или из PR в CR, будут проходить подтверждающее сканирование для оценки опухоли через 6 недель после сканирования, определяющего ответ. Если пациент продолжает исследование после подтверждающего сканирования, то пациент будет получать сканирование по обычной схеме. Позднее, сроки оценки опухоли будут зависеть от того, принимает ли пациент исследуемый препарат.

Пациентам с установленным Исследователем подтвержденным CR в соответствии с RECIST v1.1 можно прекратить прием исследуемого препарата, если они 1) получали

лечение пембролизумабом и SEQ ID NO: 1 в течение, по меньшей мере, 24 недель перед прекращением терапии и 2) получали не менее 2 лечения пембролизумабом и SEQ ID NO: 1 после даты, когда был объявлен начальный CR.

Если рентгенологическая визуализация выявляет PD, оценка опухоли может быть повторена в учреждении примерно через 4-6 недель, чтобы подтвердить PD с возможностью продолжения лечения, как описано ниже, в ожидании рентгенологического подтверждения прогрессирования. Если повторная визуализация показывает снижение опухолевой массы по сравнению с исходным сканированием, демонстрирующим PD, лечение может продолжаться в соответствии с календарем лечения.

Накапливающиеся данные указывают на то, что меньшинство пациентов, получающих иммунотерапию, могут получить клиническую пользу, несмотря на первоначальные признаки PD. Разрешение на продолжение лечения, несмотря на начальное рентгенологическое прогрессирование, принимает во внимание наблюдение, что у некоторых пациентов может быть временное обострение опухоли в первые несколько месяцев после начала иммунотерапии, но с последующим ответом заболевания. Пациентам будет разрешено продолжать лечение после первоначального PD, определенного RECIST v1.1, до тех пор, пока они соответствуют следующим критериям:

• Клиническая польза по оценке Исследователя и отсутствие быстрого прогрессирования заболевания.

• Пациент по-прежнему соответствует соответствующим критериям приемлемости, как определено медицинскими наблюдателями ION и Alkermes (или уполномоченным лицом) в ходе обсуждения с Исследователем.

• Стабильное общее состояние.

• Пациент переносит исследуемое лечение.

• Лечение вне прогрессирования не отсрочит неизбежное вмешательство для предотвращения серьезных осложнений прогрессирования заболевания (например, метастазы ЦНС).

Решение о продолжении лечения после первоначального прогрессирования, по оценке Исследователя, должно быть обсуждено с медицинскими наблюдателями ION и Alkermes (или уполномоченным лицом) и задокументировано в протоколах исследования. Контрольное сканирование должно быть проведено при следующей запланированной оценке визуализацией через 6 недель для того, чтобы определить, произошло ли уменьшение размера опухоли или продолжение PD. Оценка клинической пользы должна быть уравновешена клиническим суждением о том, наблюдается ли клиническое ухудшение состояния пациента и маловероятно ли получение какой-либо пользы от продолжения лечения. Если Исследователь считает, что пациент продолжает получать клиническую пользу, продолжая лечение, то пациент должен оставаться в исследовании и продолжать получать отслеживание в соответствии со Схемой оценок.

При определении того, увеличилась или уменьшилась опухолевая нагрузка, исследователи должны учитывать все поражения-мишени, а также поражения вне

мишени. Решение о продолжении исследования препарата после первых признаков прогрессирования заболевания, определяемых радиологической визуализацией, принимается по усмотрению Исследователя на основе клинического состояния пациента, как описано в таблице 1.

Пациенты могут получать исследуемый препарат в ожидании подтверждения PD, если они клинически стабильны в соответствии со следующими критериями:

• Отсутствие признаков и симптомов (включая ухудшение лабораторных показателей) заболевания, указывающих на прогрессирование заболевания.

• Нет ухудшения общего состояния по ECOG.

• Отсутствие быстрого прогрессирования заболевания.

• Отсутствие прогрессирующей опухоли в критических анатомических участках (например, сдавление спинного мозга), требующей неотложного альтернативного медицинского вмешательства.

Таблица 1: Визуализация опухоли/оценка прогрессирования заболевания

Оценка заболевания по RECISTv1.1	**Клинически стабильный**		**Клинически нестабильный**	
	Визуализация	**Лечение**	**Визуализация**	**Лечение**
1-е рентгенологическое свидетельство PD	Повторяют визуализацию примерно через 4-6 недель, чтобы подтвердить PD.	По усмотрению Исследователя можно продолжать прием исследуемого лекарственного средства в ожидании подтверждающего сканирования.	Повторяют визуализацию примерно через 4-6 недель, чтобы подтвердить PD, если это возможно.	Прекращают лечение, если требуется альтернативная терапия.
Повторное сканирование подтверждает PD[a]	Дополнительной визуализации не требуется	Прекращают лечение	Дополнительной визуализации не требуется	НП
Повторное сканирование показывает SD, PR или CR	Продолжают регулярные запланированные оценки визуализации	Продолжают исследование препарата по усмотрению Исследователя	Продолжают регулярные запланированные оценки визуализации	Можно возобновить прием исследуемого лекарственного

	перед каждым 3 циклом[b]		перед каждым 3 циклом[b]	средства, если состояние улучшилось и/или стало клинически стабильным по усмотрению Исследователя.

Сокращения: CR=полная ремиссия; НП=не применимо; PD=прогрессирующее заболевание; PR=частичный ответ; RECIST=критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении; SD=стабильное заболевание.

[a]Пациенты, которые в остальном клинически стабильны, могут продолжать прием исследуемого лекарственного средства по усмотрению Исследователя. Даже если пациент остается стабильным в других отношениях, прием исследуемого препарата будет прекращен, если опухолевая масса увеличится на 25% или более после первоначального подтверждения прогрессирования.

[b]Визуализация/оценка опухоли будет проводиться на исходном уровне, через 9 недель и перед каждым 3 циклом.

Ответ и прогрессирование для целей публикации будут оцениваться в этом исследовании с использованием новых международных критериев, представленных в пересмотренном руководстве RECIST v1.1. Изменения наибольшего диаметра (одномерное измерение) опухолевых поражений и наименьшего диаметра в случае злокачественных образований в лимфатических узлах будут использоваться в критериях RECIST.

Часто при иммунотерапии опухоли кажутся большими, прежде чем они уменьшатся в размере. Это может быть особенно актуально, если слитый белок SEQ ID NO: 1 приводит к проникновению NK и CD8+ Т-клеток в опухоли. Клиницистам рекомендуется рассмотреть эту возможность, чтобы избежать прекращения потенциально эффективной иммунотерапии слишком рано.

Определения

Оценка токсичности: Все пациенты подлежат оценке на токсичность с момента получения согласия.

Оценка объективного ответа: Только те пациенты, у которых на исходном уровне имеется измеримое заболевание, которые прошли хотя бы один цикл терапии и переоценили свое заболевание, будут считаться подходящими для оценки ответа. Эти пациенты будут классифицировать свой ответ в соответствии с определениями, приведенными ниже (ПРИМЕЧАНИЕ: пациенты, у которых наблюдается объективное прогрессирование заболевания до окончания 1 цикла также считаются подлежащими оценке).

Оцениваемый ответ заболевания вне мишени: Пациенты, у которых на исходном уровне имеются поражения, поддающиеся оценке, но не соответствующие определениям измеримого заболевания, получившие, по меньшей мере один цикл терапии и переоценившие свое заболевание, будут считаться подходящими для оценки для заболевания вне мишени. Оценка ответа будет основываться на присутствии, отсутствии или однозначном прогрессировании поражений.

Параметры заболевания

Измеримое заболевание: Для целей данного исследования, поддающиеся измерению поражения определяются согласно критериям RECIST v1.1. Все размеры опухоли должны быть записаны в мм (или десятичных долях сантиметров) ПРИМЕЧАНИЕ: Опухолевые поражения, расположенные в ранее облученной области могут или не могут считаться измеримыми.

Злокачественные лимфатические узлы: Чтобы считаться патологически увеличенным и поддающимся измерению, лимфатический узел должен быть ≥15 мм по короткой оси при оценке с помощью компьютерной томографии (КТ) (рекомендуемая толщина среза КТ не должна превышать 5 мм). На исходном уровни и при отслеживании, будет измеряться и отслеживаться только короткая ось.

Не поддающееся измерению заболевание: Все другие поражения (или очаги заболевания), включая небольшие поражения (наиболее длинный диаметр <10 мм или патологические лимфатические узлы с короткой осью от ≥10 до <15 мм) считаются заболеванием, не поддающимся измерению. Поражения костей, лептоменингеальное заболевание, асцит, плевральный/перикардиальный выпот, кожный/пульмональный лимфангит, воспалительное заболевание молочной железы и образования в брюшной полости (не отслеживаемые КТ или магнитно-резонансной томографией [МРТ]) считаются не поддающимися измерению.

ПРИМЕЧАНИЕ: Кистозные поражения, соответствующие критериям рентгенологически определяемых простых кист, не следует рассматривать как злокачественные поражения (ни поддающиеся измерению, ни не поддающиеся измерению), поскольку они по определению являются простыми кистами. «Кистозные поражения», которые, как считается, представляют кистозные метастазы, могут рассматриваться как измеримые поражения, если они соответствуют описанному выше определению измеримости. Однако, если у одного и того же пациента присутствуют не кистозные поражения, они предпочтительнее для выбора в качестве поражения-мишени.

Поражения-мишени: Все поддающиеся измерению поражения, максимум до 2 поражений на орган и до 5 поражений в целом, типовых для всех вовлеченных органов, должны быть идентифицированы как поражения-мишени, зарегистрированы и измерены на исходном уровне. Поражения-мишени следует выбирать на основе их размера (поражения с наибольшим диаметром), должны быть типовыми для всех вовлеченных органов, но, кроме того, должны быть такими, которые поддаются воспроизводимым повторным измерениям. В некоторых случаях может случиться так, что самое большое

поражение не поддается воспроизводимому измерению; в таких обстоятельствах следует выбрать следующее по величине поражение, которое можно воспроизводимо измерить. Сумма диаметров (самый длинный для не узловых поражений, короткая ось для узловых поражений) для всех поражений-мишеней будет рассчитана и представлена как исходная сумма диаметров. Если в сумму должны быть включены лимфатические узлы, то в сумму добавляется только короткая ось. Исходная сумма диаметров будут использоваться в качестве эталона для дальнейшей характеристики любой объективной регрессии опухоли в измеримом измерении заболевания.

Поражения вне мишени: Все другие поражения (или участки заболевания), включая любые поддающиеся измерению поражения, превышающие 5 поражений-мишеней, должны быть идентифицированы как поражения вне мишени и также должны быть зарегистрированы на исходном уровне Измерения этих поражений не требуются, но наличие, отсутствие или редкие случаи однозначного прогрессирования каждого из них следует отмечать на протяжении всего последующего наблюдения.

Способы оценки измеримого заболевания

Все измерения следует проводить и записывать в метрической системе с использованием линейки или штангенциркуля. Все базовые оценки следует проводить как можно ближе к началу лечения и не ранее, чем за 4 недели до начала лечения.

Один и тот же способ оценки и одна и та же методика должны использоваться для характеристики каждого идентифицированного и зарегистрированного поражения на исходном уровне и во время отслеживания. Оценка на основе визуализации предпочтительнее оценки при клиническом обследовании, за исключением случаев, когда отслеживаемые поражения не могут быть визуализированы и могут быть оценены только при клиническом обследовании. Способы, допустимые для оценки заболевания, следующие:

• Клиническое обследование: При поражениях кожи рекомендуется документирование с помощью цветной фотографии, включая линейку для оценки размера поражения. Клинические поражения будут считаться измеримыми только в том случае, если они поверхностные (например, кожные узелки и пальпируемые лимфатические узлы) и имеют диаметр ≥10 мм, оцененный с помощью штангенциркуля (например, кожные узелки).

• Рентген грудной клетки: Поражения на рентгенограмме грудной клетки приемлемы как измеримые поражения, если они четко очерчены и окружены аэрированными легкими. Однако, КТ является предпочтительной.

• Обычная КТ и МРТ: КТ может использоваться для измерения поражения, если толщина среза КТ составляет 5 мм или меньше. Если КТ имеет толщину среза более 5 мм, минимальный размер измеримого поражения должен быть в два раза больше толщины среза. МРТ также приемлема в определенных ситуациях (например, для сканирования тела). Для обоих способов сканирования, технические характеристики используемых последовательностей сканирования должны быть оптимизированы для оценки типа и

локализации заболевания. Метод визуализации, используемый при последующем наблюдении, должен быть таким же, как при исходном уровне, и поражения следует измерять/оценивать с помощью той же последовательности импульсов. В идеале, следует использовать тот же тип сканера, и протокол получения изображения должен максимально точно следовать предыдущим сканированиям. Сканирование тела должно выполняться с использованием способов сканирования на задержке дыхания, если возможно.

• Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)-КТ: Комбинированная ПЭТ-КТ не всегда представляет оптимальное диагностическое качество КТ для использования с измерениями RECIST. Однако, если учреждение может задокументировать, что КТ, выполненная как часть ПЭТ-КТ, имеет идентичное диагностическое качество, что и диагностическая КТ (с ВВ и пероральным контрастированием), тогда часть КТ ПЭТ-КТ может использоваться для измерений RECIST и может использоваться взаимозаменяемо с обычной КТ для точного измерения раковых поражений с течением времени.

ПЭТ с фтордезоксиглюкозой (ФДГ): Сканирование ФДГ-ПЭТ является необязательным и может использоваться в дополнение к КТ для оценки прогрессирования (особенно возможного «нового» заболевания). Новые поражения на основе ФДГ-ПЭТ могут быть идентифицированы по следующему алгоритму:

1. Отрицательный результат ФДГ-ПЭТ на исходном уровне, и положительный результат ФДГ-ПЭТ при отслеживании являются признаком PD на основании нового поражения.

2. Отсутствие ФДГ-ПЭТ на исходном уровне и положительный результат ФДГ-ПЭТ при отслеживании: если положительный результат ФДГ-ПЭТ при отслеживании соответствует новому очагу заболевания, подтвержденному КТ, это PD. Если положительный результат ФДГ-ПЭТ при отслеживании не подтверждена как как новый очаг заболевания на КТ, необходимы дополнительные последующие КТ, чтобы определить, действительно ли происходит прогрессирование в этом участке (если да, дата PD будет датой первоначального аномального сканирования ФДГ-ПЭТ). Если положительный результат ФДГ-ПЭТ при отслеживании соответствует ранее существовавшему очагу заболевания на КТ, который не прогрессирует на основании анатомических изображений, это не PD.

3. ФДГ-ПЭТ может использоваться для повышения ответа на CR аналогично биопсии в случаях, когда остаточная рентгенологическая аномалия считается представляющей фиброз или рубцевание. Использование ФДГ-ПЭТ в этом случае должно быть перспективно описано в протоколе и подтверждено медицинской литературой по конкретному заболеванию для показаний. Однако следует признать, что оба подхода могут привести к ложноположительному CR из-за ограничений разрешения/чувствительности ФДГ-ПЭТ и биопсии.

ПРИМЕЧАНИЕ. «Положительное» поражение при сканировании ФДГ-PET означает, что оно является ФДГ-авидным с поглощением более чем в два раза, чем у

окружающей ткани на изображении с поправкой на затухание.

Ультразвук бесполезен для оценки размера поражений и не должен использоваться в качестве способа измерения. Если в ходе исследования с помощью ультразвука выявляются новые очаги, рекомендуется подтверждение с помощью КТ или МРТ.

Цитологические и гистологические методы могут использоваться для дифференциации PR и CR в редких случаях (например, остаточные поражения в типах опухолей, таких как опухоли зародышевых клеток, где могут оставаться известные остаточные доброкачественные опухоли).

Цитологическое подтверждение неопластического происхождения любого выпота, который появляется или ухудшается во время лечения, когда измеримая опухоль соответствует критериям ответа или SD, является обязательным для дифференциации между ответом или SD (выпот может быть побочным эффектом лечения) и PD.

Критерии ответа

Оценка поражений-мишеней

CR: Исчезновение всех поражений-мишеней. Любые патологические лимфатические узлы (мишени или вне мишени) должны иметь уменьшение по короткой оси до <10 мм.

PR: по меньшей мере, 30% уменьшение суммы диаметров поражений-мишеней, принимая за основу исходную сумму диаметров.

PD: по меньшей мере, 20% увеличение суммы диаметров поражений-мишеней, принимая за эталон сумму в исследовании (включая исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм (ПРИМЕЧАНИЕ: появление одного или нескольких новых поражений также считается прогрессированием).

SD: Ни достаточного сокращения, чтобы квалифицировать PR, ни достаточного увеличения, чтобы квалифицировать PD, принимая во внимание наименьшие суммарные диаметры во время исследования.

Оценка поражений вне мишени

CR: Исчезновение всех поражений вне мишени и нормализация уровня онкомаркеров. Все лимфатические узлы должны быть не патологическими по размеру (<10 мм по короткой оси).

ПРИМЕЧАНИЕ. Если опухолевые маркеры изначально превышают верхний предел нормы, они должны нормализоваться, чтобы пациент считался с полным клиническим ответом.

Не-CR/Не-PD: Персистенция одного или нескольких поражений вне мишени и/или поддержание уровня онкомаркера выше нормы.

PD: Появление одного или нескольких новых поражений и/или явное прогрессирование существующих поражений вне мишени. Однозначное прогрессирование обычно не должно преобладать над статусом поражения-мишени. Оно

должно отражать общее изменение статуса заболевания, а не увеличение единичного поражения.

Хотя явное прогрессирование только поражений «вне мишени» является исключением, в таких обстоятельствах должно преобладать мнение лечащего врача, и статус прогрессирования должен быть подтвержден позже контрольной комиссией (или PI).

Оценка наилучшего общего ответа

Наилучший общий ответ представляет собой наилучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (принимая в качестве эталона для PD наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения). Критерии подтверждения наилучшего общего ответа описаны в Таблице 2 для пациентов с измеримым заболеванием и в Таблице 3 для пациентов с не измеримым заболеванием.

Таблица 2: Лучший общий ответ для пациентов с измеримым заболеванием (т.е. заболеванием-мишенью)

Поражения-мишени	**Поражения вне мишени**	**Новые поражения**	**Общий ответ**	**Наилучший общий ответ, когда требуется подтверждение**
CR	CR	Нет	CR	≥4 недель подтверждения[a]
CR	Не-CR/не-PD	Нет	PR	≥4 недель подтверждения[a]
CR	Не оценивается	Нет	PR	
PR	Не-CR/не-PD/не оценивается	Нет	PR	
SD	Не-CR/не-PD/не оценивается	Нет	SD	Задокументирован, по меньшей мере, один раз в течение ≥4 недель от исходного уровня
PD	Любой	Да или нет	PD	без предыдущего SD, PR или CR
Любой	PD[b]	Да или нет	PD	
Любой	Любой	Да	PD	

Сокращения: CR=полная ремиссия; SD=стабильное заболевание; PD=прогрессирующее заболевание; PR=частичный ответ; RECIST=критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении.

[a]Только для не рандомизированных исследований с ответом в качестве первичной конечной точки.

[b]В исключительных обстоятельствах, однозначное прогрессирование поражений вне мишени может быть принято за прогрессирование заболевания.

Примечание: пациенты с глобальным ухудшением состояния здоровья, требующие прекращения лечения без объективных доказательств прогрессирования заболевания в это время следует регистрировать как «симптоматическое ухудшение». Следует приложить все усилия для документирования объективного прогрессирования даже после прекращения лечения.

См. Описание RECIST v1.1 для получения дополнительной информации о том, что является свидетельством нового поражения.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для целей этого испытания подтверждение ответа произойдет через 6 недель после измерений, определяющих ответ, а не через 4 недели, указанные в критериях RECIST v1.1.

Таблица 3: Наилучший общий ответ для пациентов с не поддающимся измерению заболеванием (т.е. заболеванием вне мишени)

Поражения вне мишени	**Новые поражения**	**Общий ответ**
CR	Нет	CR
Не-CR/не-PD	Нет	Не-CR/не-PD[a]
Не все оцениваются	Нет	Не оцениваются
Однозначный PD	Да или нет	PD
Любой	Да	PD

Сокращения: CR=полная ремиссия; PD=прогрессирующее заболевание; SD=стабильное заболевание.

[a]«Не-CR/не-PD» предпочтительнее «стабильного заболевания» для заболевания вне мишени, поскольку SD все чаще используется в качестве конечной точки для оценки эффективности в некоторых испытаниях, поэтому назначать эту категорию, когда нет поражений, которые нельзя измерить, не рекомендовано.

Длительность ответа

Продолжительность общего ответа: Продолжительность общего ответа измеряется с момента, когда критерии измерения соответствуют CR или PR (в зависимости от того, что зарегистрировано первым), до первой даты объективного документирования рецидива или PD (принимая в качестве эталона для PD наименьшие зарегистрированные измерения с момента начала лечения).

Продолжительность общего CR измеряется с момента первого удовлетворения критериев измерения CR до первой даты объективного документирования PD.

Продолжительность SD: продолжительность SD измеряется с начала лечения до достижения критериев прогрессирования, принимая за основу наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения, включая измерения на исходном уровне.

Лабораторные оценки

Образцы крови и мочи для лабораторных исследований будут собираться в моменты времени, указанные в Таблице 4. Специфические оценки развернутого анализа крови (CBC) с дифференциалом, полного биохимического анализа сыворотки и анализа

мочи перечислены в Таблице 10. Образцы будут собираться в соответствии с обычными процедурами медицинского учреждения и проанализированы в лаборатории медицинского учреждения на CBC с дифференциалом, полным биохимическим анализом сыворотки и анализом мочи.

Лабораторные тесты для скрининга должны быть выполнены в течение 10 дней до первой дозы лечения. После цикла 1 лабораторные процедуры перед введением дозы могут быть проведены за 72 часа до введения дозы в 1 день каждого цикла. Результаты должны быть рассмотрены Исследователем или квалифицированным уполномоченным лицом и признаны приемлемыми перед каждой дозой исследуемого препарата.

Если медицинское учреждение не может собрать все образцы из-за низкого уровня гемоглобина или других проблем, таких как доступ к венам, образцы должны быть собраны в следующем порядке, если это требуется во время посещения:

• Образцы для токсичности/безопасности

• Гуморальные анализы (на основе плазмы и сыворотки)

• Клеточные анализы (на основе мононуклеарных клеток периферической крови [PBMC]).

Лабораторные корреляционные исследования

Образцы будут собраны для нескольких запланированных корреляционных исследований в определенные моменты времени. Многие образцы будут обработаны и сохранены для анализа партиями. Когда объем крови ограничен, корреляционные исследования будут считаться вторичными по сравнению с тестами, необходимыми для принятия клинических решений. Также, тестирование может быть отложено или пропущено, если сбор образцов может представлять опасность для пациента, если образцы невозможно обработать или проанализировать, или если результаты признаны не существенными для достижения целей исследования.

Корреляционные исследования с биопсией

Сбор опухолевой ткани до лечения (свежая биопсия с помощью эксцизионной, инцизионной или толстой иглы и достаточного размера, чтобы показать архитектуру ткани) является обязательным; если сбор ткани до лечения невозможен (например, недоступность или угроза безопасности пациента), возможна отправка архивного образца по согласованию со Спонсором. Получение биопсии после лечения (второй) является обязательным для достижения целей протокола и изучения TME после лечения, но может быть исключено из соображений безопасности пациента только после обсуждения со Спонсором. Корреляты на основе биопсии считаются исследовательскими. Приоритизация образцов биопсии будет проведена на основе технических соображений, которые будут включены в Лабораторное руководство, общее количество полученных образцов и возможность проведения корреляционного исследования на основе вышеизложенных соображений.

Биопсия перед лечением будет взята после проведения всех скрининговых оценок и перед введением первой дозы пембролизумаба и слитого белка SEQ ID NO: 1 в цикле 1,

неделе 1, дне 1. Образец перед лечением можно получить в течение 6 недель (42 дня) до начала лечения в День 1, при условии, что было получено информированное согласие на исследование или биопсия была выполнена в рамках обычного ухода за пациентом. Пост-лечебная (вторая) биопсия будет выполняться на том же или аналогичном участке опухоли во время первого цикла терапии в C1D12 или в любое время с C1D8 по C1D19. Тонкоигольный пунктат не допускается для взятия образцов тканей, но могут использоваться для локализации активного заболевания перед взятием образцов тканей. Биоптаты будут собираться в соответствии со стандартными операционными процедурами клинического учреждения (SOP).

Экспрессия PD-L1 в опухоли и мультипараметрическая иммуногистохимия

Поскольку инфильтрирующие опухоль иммунные клетки связаны с клиническими исходами, инфильтраты из опухолевой ткани до лечения и из биопсий, взятых во время лечения, будут оцениваться с помощью IHC для определения степени и природы Т-клеточной инфильтрации и иммунной среды TME. Экспрессия PD-L1 будет количественно оцениваться в исходных образцах опухолей, фиксированных формалином и залитых парафином. Кроме того, для дальнейшей характеризации инфильтрата иммунных клеток, опухоли также могут быть проанализированы с помощью IHC на множество других маркеров, включая, помимо прочего, CD56 и CD16 (NK клетки), CD68, CD8, PD-1, TIM-3 и LAG3.

Полный геном, полный экзом и геномное секвенирование РНК опухолевых клеток из ткани по сравнению с не опухолевыми клетками из цельной крови будет профилировано для выявления геномных вариаций, которые могут способствовать ответу или прогрессированию заболевания, и получения понимания молекулярных аномалий. Если применимо, бремя мутаций будет количественно определено и проанализировано подгруппами пациентов с последовательностями HPV или воздействием факторов окружающей среды, таких как анамнез употребления табака. Экспрессия генов будет анализироваться с помощью секвенирования РНК и сравниваться с мутациями дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Уровни экспрессии белка могут быть проанализированы на представляющие интерес гены, кодирующие белок, на основе статуса мутации или результатов экспрессии.

Все геномные и транскриптомные анализы будут ретроспективными и исследовательскими. Для определения геномного профиля опухолей пациентов и идентификации генных мутаций, амплификации генов, уровней экспрессии РНК и белков, будут оцениваться корреляции между геномными/транскриптомными профилями и результатами эффективности. Мутационная нагрузка опухоли может быть оценена с помощью FOUNDATIONONE® или другого анализа TMB, в зависимости от ситуации.

Профилирование экспрессии генов в биопсии

Анализы экспрессии рибонуклеиновой кислоты будут выполняться с использованием технологии nanoString или аналогичной технологии для выявления потенциальных признаков, коррелирующих с моделями инфильтрации опухолевых Т-

клеток и клиническим ответом. Хотя технология nanoString не различает источник нуклеиновой кислоты (опухолевые клетки, лимфоциты или другие инфильтрирующие клетки), различные паттерны из не разделенной клеточной смеси могут коррелировать с клиническими исходами Эти профили экспрессии генов могут предоставить дополнительный подробный фенотип для проведения корреляционного исследования.

Клональность Т-клетки

Оценка клональности Т-клеток будет включать TCR секвенирование инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), если доступны биопсии до лечения и после лечения. Высокопроизводительное секвенирование бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCRB) будет проводиться на выделенной геномной ДНК и полимеразной цепной реакцией (ПЦР), амплифицированной из фиксированных образцов опухоли (до и после лечения) с использованием набора immunoSEQ™ TCRB человека (hsTCRB) (Adaptive Biotechnologies) и секвенированная на платформе Illumina MiSeq либо с использованием общих ресурсов (Центр исследования рака Фреда Хатчинсона [FHCRC]) либо по контракту с Adaptive Biotechnologies (Seattle) или другим подобным подрядчиком.

Корреляционные исследования с взятой кровью

Иммунофенотипирование мононуклеарных клеток периферической крови

Образцы крови будут собираться в различные моменты исследования. Изменение частоты Т-клеток (CD3+CD4+CD56- и CD3+CD8+CD56-) и NK клеток (CD3-CD56+) в результате лечения слитым белком SEQ ID NO: 1 в присутствии пембролизумаба будет оцениваться с помощью проточной цитометрии с использованием цельной крови и/или PBMC. Образцы будут отправлены в Центральную лабораторию иммунного мониторинга (CIML) для анализа. Эти данные не будут использоваться для принятия клинических решений по этому протоколу. Для этого, CIML будет иммунофенотипировать клетки в цельной крови, используя 22-цветную панель фенотипирования цельной крови. Эта панель характеризует и количественно определяет абсолютное количество и долю подмножеств Т-клеток памяти и наивных, используя антитела к CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD28, CD127 и CD62L; Treg, используя антитела к CD127 и CD25; и состояние активации Т-клеток используя антитела к CTLA-4, PD-1, HLA-DR, Tim-3, Lag-3, и TIGIT. Та же панель будет оценивать и количественно определять абсолютное количество NK клеток (CD56+CD3-), NK-Т-клеток (CD56+CD3+), В-клеток (CD19+), моноцитов (CD16+), дендритных клеток (HLA-DR+ CD123+ или CD11c+) и нейтрофилов (CD14+).

Клетки-супрессоры, полученные из миелоидов периферической крови, также могут быть оценены на отдельной панели с использованием HLA-DR, CD11b и CD33 вместе с другими маркерами линии.

Для фенотипического анализа, абсолютное количество и долю клеток, положительных на маркер и/или среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в моменты времени после введения исследуемого лекарственного средства, будут сравнивать с исходным уровнем, и изменение будет рассчитываться как # после/# исходного уровня, % после/% исходного уровня или MFI после/MFI исходного уровня.

Анализ функции Т- и NK-клеток

Для оценки пролиферативной функции Т- и NK-клеток будет проанализирована внутриклеточная экспрессия Ki-67 в контексте фенотипической характеристики CD4+ и CD8+ α/β и γ/δ Т-клеток и CD3-CD56+ NK-клеток среди PBMC.

Действие слитого белка SEQ ID NO: 1 на функцию NK-клеток будет измеряться с помощью проточной цитометрии экспрессии маркера дегрануляции CD107a и секреции цитокинов (т.е. IFN-γ и фактора некроза опухоли-α). Способность NK клеток отвечать на определенные стимулы (связанные на планшете анти-CD16, IL12 плюс IL18 и стандартная NK-стимулирующая клеточная линия, K562), приводящие к дегрануляции NK-клеток или секреции цитокинов, будет сравниваться до и после лечения SEQ ID NO: 1. Будут оцениваться данные об изменениях дегрануляции и секреции цитокинов с течением времени как в не стимулированных, так и в стимулированных условиях (связанные на планшете анти-CD16, IL-12 плюс IL-18 и стандартная NK-стимулирующая клеточная линия, K562). После учета фоновой дегрануляции и секреции цитокинов, доля CD3-CD56+ NK-клеток, экспрессирующих CD107a или цитокины в моменты времени после дозирования, будет поделена на результаты в момент времени до лечения, чтобы определить кратность разницы между ними. Другие условия и маркеры могут быть протестированы для получения оптимальных оценок функции NK-клеток и Т-клеток. Эти анализы будут выполняться в CIML или Вашингтонском университете, Сиэтл, или у другого согласованного поставщика.

Анализы цитокина плазмы

Изменения концентрации провоспалительных и иммунодепрессивных цитокинов в плазме могут коррелировать с введением слитого белка SEQ ID NO: 1. Это также послужит важной оценкой для проверки и сравнения терапевтического эффекта слитого белка SEQ. ID NO: 1 с пембролизумабом по сравнению с предыдущими исследованиями. Образцы исходного уровня и после лечения будут собираться через 4-6 часов после введения слитого белка SEQ ID NO: 1 и тестироваться в мультиплексных цитокиновых ферментных иммуносорбентных анализах (ELISA или Luminex). Плазма на цитокины и сыворотка на антитела к лекарственному средству (ADA)/иммуногенность будут обрабатываться локально, партиями доставляться в CIML и распределяться по местам анализов.

Соотношение кинуренин/триптофан и уровни аргинина в плазме

Соотношение кинуренина к триптофану в плазме будет измеряться в начале лечения, во время лечения и в конце лечения в соответствии с этим протоколом для анализа у пациентов, у которых не был достигнут клинический ответ на лечение, где неудача быть связана с повышенными уровнями Kyn/Trp.

Уровни аргинина в плазме будут измеряться на исходном уровне, во время лечения и в конце лечения в соответствии с этим протоколом, чтобы проанализировать у пациентов, у которых не был достигнут клинический ответ на лечение, где неудача может быть связана с повышенным уровнем аргинина в плазме.

Иммуногенность слитого белка SEQ ID NO: 1

Пациенты будут контролироваться на присутствие и развитие аутоантител к слитому белку с SEQ ID NO: 1. Серийные образцы сыворотки будут оцениваться от исходного уровня, в 1 день каждого цикла и через 14 дней после последнего лечения.

В анализ иммуногенности будут включены все пациенты, отвечающие критериям отбора, имеющие образцы, поддающиеся анализу, и получившие, по меньшей мере, 1 дозу слитого белка SEQ ID NO: 1. Анализ подмножества будет проспективно проанализирован для всех пациентов, завершивших каждый полный цикл получения слитого белка SEQ ID NO: 1.

Иммунное тестирование будет проходить по аналогичной схеме с каждым циклом слитого белка SEQ ID NO: 1. Образцы сыворотки для оценки индукции анти-SEQ ID NO: 1 антитела будут получены от каждого пациента в заранее определенные моменты времени. Подтвержденный способ электрохемилюминесценции с использованием платформы Meso Scale Discovery будет использоваться для обнаружения ADA к слитому белку SEQ ID NO: 1 в сыворотке человека. Оценка индукции иммунного ответа для каждого исследуемого пациента будет основываться на сравнении образца до и после дозирования. Оставшиеся образцы сыворотки будут храниться для потенциального анализа индукции анти-пембролизумаб антитела в будущем.

ПРИМЕЧАНИЕ: Сбор крови для всех необходимых образцов иммуногенности должен быть взят до того, как пациент получит слитый белок SEQ ID NO: 1 в любой запланированный день.

Анализ микробиома

Образцы кала будут собираться у пациентов на исходном уровне и использоваться для таксономического профилирования с помощью секвенирования гена 16S рРНК и метагеномного секвенирования WGS. Образцы фекалий будут собираться и храниться с использованием стандартных процедур сбора кала в домашних условиях, и будет оцениваться ландшафт кишечного микробиома. Данные секвенирования будут проанализированы и сравнены с клиническими ответами, чтобы определить, может ли ответ или отсутствие ответа на лечение коррелировать с конкретной микробиотой. Анализы будут выполняться в сотрудничестве с доктором Дэвидом Фредриксом (FHCRC) или другим согласованным поставщиком.

Патентная и научная литература, на которую делается ссылка в настоящем документе, устанавливает знания, доступные специалистам в данной области техники. Все патенты США и опубликованные или не опубликованные патентные заявки США, цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки. Все опубликованные иностранные патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе настоящим включены посредством ссылки. Все другие опубликованные ссылки, документы, рукописи и научная литература, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 2. Клинические результаты лечения больных раком яичников слитым

белком SEQ ID NO: 1 в комбинации с анти-PD-1 антителом: исследование ARTISTRY-1

Способы: ARTISTRY-1 представляет собой продолжающееся мультикогортное исследование фазы 1/2, в котором изучается лечение слитым белком SEQ ID NO: 1, вводимым внутривенно (ВВ) в виде монотерапии и в комбинации с анти-PD-1 антителом, пембролизумабом. Пациенты с раком яичников (ОС) были включены в когорту пациентов со смешанными анти-PD1/PD-L1 неодобренными типами опухолей, которые прогрессировали на предыдущей химиотерапии. Пациенты с ОС получали ВВ слитый белок SEQ ID NO: 1 (3 мкг/кг) в дни 1-5 и пембролизумаб (200 мг) в день 1 21-дневного цикла. Представленные результаты включают противоопухолевую активность (RECIST v1.1) и безопасность. Чтобы понять микроокружение опухоли, были собраны биопсии до лечения и во время лечения.

Результаты: В исследование были включены четырнадцать преимущественно резистентных к препаратам платины пациентов с ОС, получавших интенсивное предварительное лечение. Пациенты получали в среднем 5 (диапазон 2-11) предшествующих терапевтических схем; все ранее получали терапию на основе платины. Среди 13 пациентов с оценкой ≥1, у 9 наблюдался контроль над заболеванием и у 4 наблюдалось прогрессирование заболевания. У трех пациентов с BRCA дикого типа и анти-PD-1/PD-L1-наивных пациентов наблюдался объективный ответ, включая 1 полный ответ, 1 частичный ответ (PR) и 1 неподтвержденный PR. У пяти пациентов наблюдалось снижение опухолевой массы (таблица 5). Связанные с лечением нежелательные явления в испытанных дозах были, как правило, временными и управляемыми. В целом, комбинация со слитым белком SEQ ID NO: 1 не продемонстрировала какой-либо дополнительной токсичности по сравнению с уже установленной для пембролизумаба. Дополнительные данные по безопасности и эффективности собираются в продолжающихся когортах. Монотерапия слитым белком SEQ ID NO: 1 также увеличивала маркеры лимфоцитарной инфильтрации в 1 парной биопсии (1 из 1; биопсия во время лечения в цикле 2); плотность $CD8^+$ Т-клеток и оценка доли опухоли PD-L1 увеличились в 5,2 и в 11 раз, соответственно, что демонстрирует иммуностимулирующее воздействие слитого белка SEQ ID NO: 1 на микроокружение опухоли и поддерживает обоснование дальнейшей оценки слитого белка SEQ ID NO: 1 с пембролизумабом (фигуры 4A-4C).

Таблица 5: Сущность наблюдений за ответом пациентов с раком яичников

Пациент	**Возраст (лет)**	**Предшествующие терапии[b]**	**Максимальное уменьшение поражений-мишеней (%)**	**OR[a]**	**CA125 (Ед/мл) ответ от исходного уровня**	**Время на слитом белке SEQ ID NO: 1 (недели)**

1	48	CBP/PAC/BEV, CDDP/GEM, CBP/PLD, PCA, CBP/DOC	70,0	CR[b]	Нормализован от 282 до 24,5 на 4 цикле	81+[c]
2	83	CBP/PAC/DOC, CBP/DOC/NIR/TAM	76,3	PR	Нормализован от 125 до 16 на 4 цикле	23+[c]
3	60	CBP/PAC, CBP/PLD, CBP/BEV, PAC/BEV, BEV, PLD	44,7	uPR	Уменьшен от 1400 до 260 на 4 цикле	34
4	75	CBP/PAC, PLD/BEV, CBP/GEM, TOP, NIR	21,9	SD	Уменьшен от 493 до 245 на 5 цикле	14+[c]
5	83	CBP/PAC, CBP, CBP/PAC/CAP, CBP/PLD, CBP/PLD	18,3	SD	Нормальный на исходном уровне при 10,6	21+[c]

[a] По оценке исследователя.

[b] CR из-за уменьшения узла до <10 мм по короткой оси, что считается нормальным.

[c] Пациент в настоящее время находится в испытании.

BEV, бевацизумаб; CAP, капецитабин; CBP, карбоплатин; CDDP, цисплатин; CR, подтвержденный ответ; DOC, доцетаксел; GEM, гемцитабин; max. максимум; NIR, нирапариб; OR, объективный ответ; PAC, паклитаксел; PCA, паклитаксел-альбумин; PD, прогрессирующее заболевание; PLD, пегилированный липосомальный гидрохлорид доксорубицина; SD, стабильное заболевание; TAM, тамоксифен, TOP, топотекан; uPR, неподтвержденный частичный ответ.

Выводы. Комбинированное лечение слитым белком SEQ ID NO: 1 и антителом анти-PD-1 продемонстрировало приемлемый профиль безопасности и обеспечило клиническую активность за счет стойкого сокращения опухоли и стабилизации заболевания у пациентов с рецидивирующим ОС.

Пример 3. Подкожное введение слитого белка SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии и в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях: ARTISTRY-2

Способы: ARTISTRY-2 (NCT03861793) представляет собой продолжающееся исследование фазы 1/2 по подкожной (ПК) доставке слитого белка SEQ ID NO: 1 с и без анти-PD1 антителом, пембролизумабом. На фазе 1, ПК дозы слитого белка SEQ ID NO: 1 вводили по схеме каждые 7 дней [q7d] или каждый 21 день [q21d] в течение 6-недельного вводного периода с последующей комбинацией с ВВ пембролизумабом 200 мг q21d. Каждый пациент, отнесенный к данной когорте, получал слитый белок SEQ ID NO: 1 в виде разовой дозы и по схеме либо q7d, либо q21d. Безопасность, переносимость, дозолимитирующая токсичность (DLT) и фармакокинетика/фармакодинамика при увеличении дозы.

Результаты: 38 пациентов лечили слитым белком с SEQ ID NO: 1 в 7 назначенных когортах с ПК дозами в диапазоне от 0,3 мг до 10 мг (средний возраст 61,5 [28-82] года; среднее количество предшествующих терапий 4 [0-17]; 45% ранее получали иммунотерапию). 25 пациентов завершили монотерапию и начали комбинированную терапию. Средняя продолжительность лечения составила 64,5 (1-506) дней. Системное воздействие слитого белка SEQ ID NO: 1 увеличивалось с повышение дозы, что приводило к дозозависимому увеличению числа циркулирующих естественных киллеров и $CD8^+$ Т-клеток без существенного влияния на регуляторные Т-клетки. В целом, вызванные лечением нежелательные явления (TEAE) возникли у 33 (86,8%) пациентов. Связанные с лечением АЕ (TRAE; по оценке исследователя) наблюдались у 32 (84,2%) пациентов, и наиболее распространенные TRAE представлены в таблице 6. У одного пациента развилось серьезное TRAE, транзиторное усугубление клинических проявлений вспышка опухоли 3 степени, проявляющееся в виде обструкции толстой кишки; максимально переносимая доза не была достигнута.

Таблица 6: Наиболее распространенные (≥ 20%) TRAE в целом и в зависимости от схемы дозирования

	q7d				q21d			q7d+q21 d Всего (N=38)
	0,3 мг (n=7)	0,6 мг (n=3)	1 мг (n=7)	3 мг (n=7)	1 мг (n=4)	3 мг (n=4)	10 мг (n=6)	
Пациенты с ≥1 TRAE, связанным со слитым белком SEQ ID NO: 1 n (%)	7 (100)	2 (66,7)	7 (100)	5 (71,4)	4 (100)	4 (100)	3 (50)	32 (84,2)
Реакции в месте	6	1 (33,3)	3	4 (57,1)	4	3 (75)	2	23 (60,5)

введения[a], n (%)	(85,7)		(42,9)		(100)		(33,3)	
Гипертермия, n (%)	4 (57,1)	0	2 (28,6)	4 (57,1)	0	3 (75)	2 (33,3)	15 (39,5)
Лимфопения, n (%)	1 (14,3)	0	4 (57,1)	3 (42,90)	2 (50,0)	1 (25,0)	2 (33,3)	13 (34,2)
Озноб, n (%)	3 (42,9)	0	1 (14,3)	3 (42,9)	0	3 (75,0)	2 (33,3)	12 (31,6)
Утомляемость, n (%)	4 (57,1)	0	1 (14,3)	2 (28,6)	1 (25,0)	1 (25,0)	1 (16,7)	10 (26,3)
Тошнота, n (%)	4 (57,1)	0	0	1 (14,3)	0	2 (50)	2 (33,3)	9 (23,7)

[a] Реакции в месте инъекции включают эритему, реакцию, зуд, боль, отек, раздражение, воспаление и повышение температуры в месте инъекции.

Выводы. Профиль безопасности ПК согласуется с известными и ожидаемыми фармакологическими эффектами слитого белка SEQ ID NO: 1. Согласуясь с ВВ введением, ПК введение слитого белка SEQ ID NO: 1 q7d или q21d поддерживало желаемый иммунный ответ, что продемонстрировано фармакодинамическими результатами. Потенциально более низкие показатели лихорадки и озноба, наблюдаемые по сравнению с ВВ введением, предположительно согласуются с более низкими пиковыми концентрациями, достигаемыми при ПК введении.

Пример 4. Слитый белок IL-2:IL-2Rα с круговыми перестановками (cp) в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек у мышей с опухолями.

Мыши с опухолями MC38:

Дизайн исследования, показанный ниже в таблице 7, был реализован для модели колоректальной опухоли MC38.

Таблица 7 - Дизайн исследования, реализованный для модели колоректальной опухоли MC38

Группа	**N**	**Агент**	**Доза препарата**	**Путь**	**Схема**
1	10	носитель 1 // носитель 2	нп // нп	ПК // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // biwkx2 (дни 1, 4, 8, 11)
2	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // носитель 2	9 мг/кг // нп	ПК // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // biwkx2 (дни 1, 4, 8, 11)
3	10	носитель 1 // анти-PD-1 (RMP1-14)	нп // 100 мкг	ПК // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // biwkx2 (дни 1, 4, 8, 11)

4	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2// анти-PD-1 (RMP1-14)	9 мг/кг // 100 мкг	ПК // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // biwkx2 (дни 1, 4, 8, 11)
5	10	носитель 1 // анти-CTLA-4 (9D9) // анти-CTLA-4 (9D9)	нп // 100 мкг // 50 мкг	ПК // ВБ // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // день 1 // день 4, 7
6	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // анти-CTLA-4 (9D9) // анти-CTLA-4 (9D9)	9 мг/кг // 100 мкг // 50 мкг	ПК // ВБ // ВБ	дни 6, 10, 14, 18, 22 // день 1 // день 4, 7

N=количество мышей в исследовании; нп=неприменимо; ПК=подкожно; ВБ=внутрибрюшинно

Слитый белок SEQ ID NO: 2 является мышиным ортологом слитого белка SEQ ID NO: 1. Когда SEQ ID NO: 2 комбинировали с анти-PD-1 антителом, ингибирование роста опухоли (TGI) увеличивалось с 45-60% для монотерапии до 74% для комбинированной терапии. Комбинированная терапия также приводила к 2 полным ответам (фигура 5A и фигура 5B). Когда слитый белок SEQ ID NO: 2 комбинировали с анти-CTLA-4 антителом, TGI увеличилось с 43-60% для монотерапии до 84% для комбинированной терапии. Комбинированная терапия также привела к 5 полным ответам (фигура 6A и фигура 6B).

В целом, результаты демонстрируют, что комбинация слитого белка cpIL-2:IL-2Rα и ингибитора иммунных контрольных точек (например, анти-PD-1 или анти-CTLA-4) усиливает противоопухолевый ответ, например, при колоректальном раке.

Мыши с опухолями B16F10:

Схема исследования, показанная ниже в таблице 8, была реализована для модели опухоли меланомы MC38.

Таблица 8 - Дизайн исследования, реализованный для модели опухоли меланомы B16F10

Группа	**N**	**Агент**	**Доза препарата**	**Путь**	**Схема**
1	12	носитель 1 // носитель 1	нп // нп	ПК // ВБ	5/2/5/2/5 (начало на 6 день) // biwk x 3
2	12	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // носитель 1	9 мг/кг // нп	ПК // ВБ	дни 6,10,14,18,22,26 // biwk x 3

3	12	носитель 1 // анти-CTLA-4 9D9 - AKM //анти-CTLA-4 9D9 - AKM	нп // 100 мкг/животное //50 мкг/животное	ПК // ВБ // ВБ	5/2/5/2/5 (начало на 6 день) // день 1 // дни 4, 7
4	12	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // анти-CTLA-4 9D9-AKM // анти-CTLA-4 9D9-AKM	9 мг/кг // 100 мкг/животное //50 мкг/животное	ПК // ВБ // ВБ	дни 6,10,14,18,22,26 // день 1 // дни 4,7

Когда слитый белок SEQ ID NO: 2 комбинировали с антителом анти-CTLA-4, TGI увеличивалось с 3-36% для монотерапии до 62% для комбинированной терапии (фигура 7A и фигура 7B).

Мыши с опухолями EMT-6:

Дизайн исследования, показанный ниже в таблице 9, был реализован для модели опухоли молочной железы EMT-6.

Таблица 9 - Дизайн исследования, реализованный для модели опухоли молочной железы EMT-6

Группа	**N**	**Агент**	**Доза препарата**	**Путь**	**Схема**
1	10	носитель 1 // носитель 1	нп // нп	ПК // ВБ	5/2/5 (начало на 5 день) // biwk x 2 (начало на 5 день)
2	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // носитель 1	0,8 мг/кг // нп	ПК // ВБ	5/2/5 (начало на 10 день) // biwk x 2 (начало на 5 день)
3	10	носитель 1 // анти-PD-1 RMP1-14 - AKM	нп // 100 мкг/животное	ПК // ВБ	5/2/5 (начало на 10 день) // biwk x 2 (начало на 5 день)
4	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // анти-PD-1 RMP1-14 - AKM	0,8 мг/кг // 100 мкг/животное	ПК // ВБ	5/2/5 (начало на 10 день) // biwk x 2 (начало на 5 день)
5	10	носитель 1 // носитель 1	нп // нп	ПК // ВБ	дни 6,10,14,18,22,26 // biwk x 3
6	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // носитель 1	9 мг/кг // нп	ПК // ВБ	дни 6,10,14,18,22,26 // biwk x 3
7	10	носитель 1 // анти-CTLA-4	нп // 100	ПК //	дни 6,10,14,18,22,26 //

		9D9 - AKM //анти-CTLA-4 9D9 - AKM	мкг/животное //50 мкг/животное	ВБ // ВБ	день 1 // дни 4,7
8	10	Слитый белок SEQ ID NO: 2 // анти-CTLA-4 9D9-AKM // анти-CTLA-4 9D9-AKM	9 мг/кг // 100 мкг/животное //50 мкг/животное	ПК // ВБ // ВБ	дни 6,10,14,18,22,26 // день 1 // дни 4,7

Когда слитый белок SEQ ID NO: 2 комбинировали с анти-PD-1 антителом, TGI повышалось с 14-17% для монотерапии до 43% для комбинированной терапии (фигура 8A и фигура 8B). SEQ ID NO: 2 комбинировали с анти-PD-1 антителом, TGI увеличивалось с 14-17% для монотерапии до 43% для комбинированной терапии (фигура 8A и фигура 8B). Когда слитый белок SEQ ID NO: 2 комбинировали с анти-CTLA-4 антителом, TGI увеличивалось с 28-31% для монотерапии до 77% для комбинированной терапии Комбинированная терапия также приводила к 2 полным ответам (фигура 9A и фигура 9B).

Хотя данное изобретение было подробно показано и описано со ссылками на его предпочтительные варианты, специалистам в данной области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения формы и деталей, не выходя за рамки объема изобретения, охватываемого прилагаемой формулой изобретения. Также следует понимать, что ни один из описанных в настоящем документе вариантов осуществления не является взаимоисключающим и может комбинироваться различными способами без отклонения от объема изобретения, охватываемого прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий:

i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта; и

ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора иммунных контрольных точек;

где стадию (i) проводят до, после или одновременно со стадией (ii),

где у пациента ранее не удавалось достичь полного или частичного ответа на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, и

где вариант слитого белка, по меньшей мере, на 80% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 1.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что у пациента ранее не удавалось добиться полного или частичного ответа на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, как определено по критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или в соответствии с критериями irRECIST. (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей).

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что у пациента ранее не удавалось добиться полного ответа на предыдущее лечение или на продолжающееся лечение ингибитором иммунных контрольных точек, как определено по критериям RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей при лечении) или в соответствии с критериями irRECIST (критерии оценки иммунноопосредованного ответа солидных опухолей).

4. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

5. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой пембролизумаб.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA4 антитело.

7. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ипилимумаб.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту парентерально.

9. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно.

10. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно.

11. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта

представляет собой дозу слитого белка SEQ ID NO: 1 или его варианта, равную примерно 0,1 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3 мкг/кг, 3,5 мкг/кг, 4 мкг/кг, 4,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 5,5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 7 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 8 мкг/кг, 8,5 мкг/кг, 9 мкг/кг, 9,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 10,5 мкг/кг, 11 мкг/кг, 11,5 мкг/кг, 12 мкг/кг, 12,5 мкг/кг, 13 мкг/кг, 13,5 мкг/кг, 14 мкг/кг или 14,5 мкг/кг.

12. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту в дозе примерно 3 мкг/кг.

13. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 3 мкг/кг.

14. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту ежедневно в течение пяти дней подряд.

15. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту в дозе примерно 0,3 мг, примерно 0,6 мг, примерно 1 мг, примерно 3 мг или примерно 10 мг.

16. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,3 мг, примерно 0,6 мг, примерно 1 мг, примерно 3 мг или примерно 10 мг.

17. Способ по любому из пп.15 или 16, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

18. Способ по п.5, отличающийся тем, что пембролизумаб вводят пациенту в дозе 200 мг.

19. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе 200 мг.

20. Способ по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что пембролизумаб вводят пациенту один раз каждые три недели.

21. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 3 мкг/кг ежедневно в течение пяти дней подряд, каждые три недели, и

где пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели.

22. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,3 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 0,3 мг один раз в неделю в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

23. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его

вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 0,6 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят подкожно пациенту в качестве монотерапии в дозе примерно 0,6 мг один раз в неделю в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

24. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 1 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят подкожно пациенту в качестве монотерапии в дозе примерно 1 мг один раз в неделю в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

25. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 3 мг один раз в неделю, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок с SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 3 мг один раз в неделю в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

26. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 1 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят подкожно пациенту в качестве монотерапии в дозе примерно 1 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

27. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 3 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят подкожно пациенту в качестве монотерапии в дозе примерно 3 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

28. Способ по п.5, отличающийся тем, что слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в дозе примерно 10 мг один раз каждые три недели, и пембролизумаб вводят пациенту внутривенно в дозе примерно 200 мг один раз каждые три недели, где слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант вводят пациенту подкожно в качестве монотерапии в дозе примерно 10 мг один раз каждые три недели в течение 6 недель до введения пембролизумаба.

29. Способ по любому из предшествующих пп., где у пациента не удалось достичь полной ремиссии (CR) после предыдущей терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

30. Способ по любому из предшествующих пп., где у пациента наблюдается стабильное заболевание (SD) или частичный ответ (PR) без дальнейшего уменьшения

размера опухоли или ответа после предыдущей терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

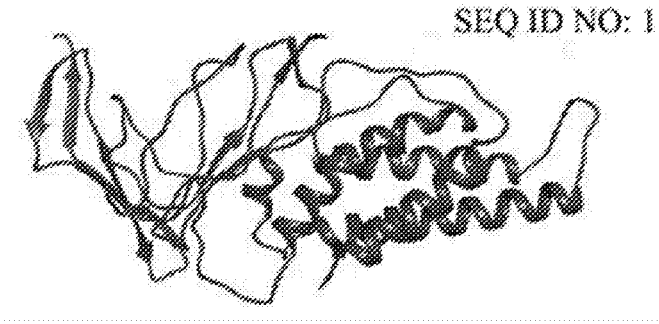
31. Способ по пп. 29 и 30, отличающийся тем, что предыдущая терапия ингибиторами иммунных контрольных точек включает одну или несколько из анти-PD-1 терапии, анти-PD-L1 терапии и анти-CTLA-4 терапии.

32. Способ по любому из предшествующих пп., где способ приводит к одному или нескольким из следующих исходов для пациента: увеличение продолжительности ответа (DOR); увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS); увеличение времени до прогрессирования (TTP); и повышение общей выживаемости (OS) по сравнению с пациентами, получающими слитый белок SEQ ID NO: 1 или ингибитор иммунных контрольных точек в качестве монотерапии.

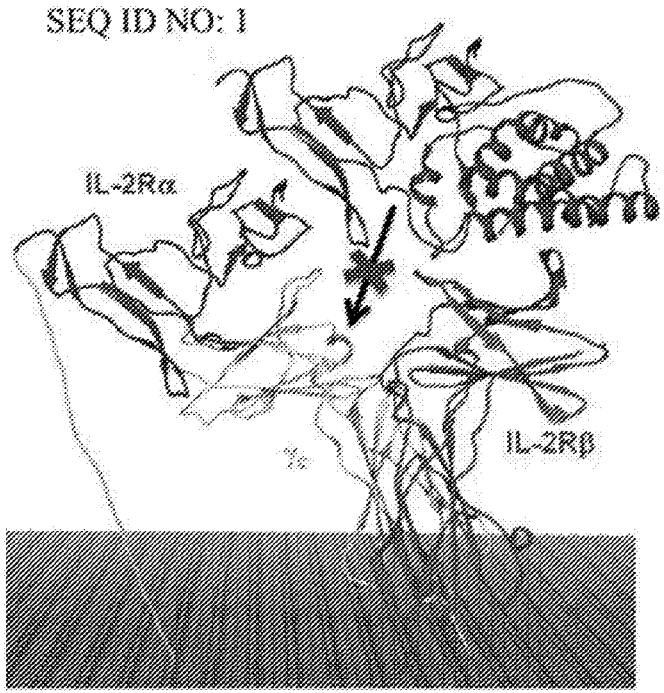
33. Способ по любому из предшествующих пп., где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака головы и шеи, рака яичников, колоректального рака, меланомы и рака молочной железы.

34. Набор, содержащий слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант, поставляемый в стерильном контейнере, который может быть в форме фармацевтической композиции, подходящей для введения субъекту, и ингибитор иммунных контрольных точек, поставляемый в отдельном стерильном контейнере или в том же стерильном контейнере, что и слитый белок SEQ ID NO: 1 или его вариант.

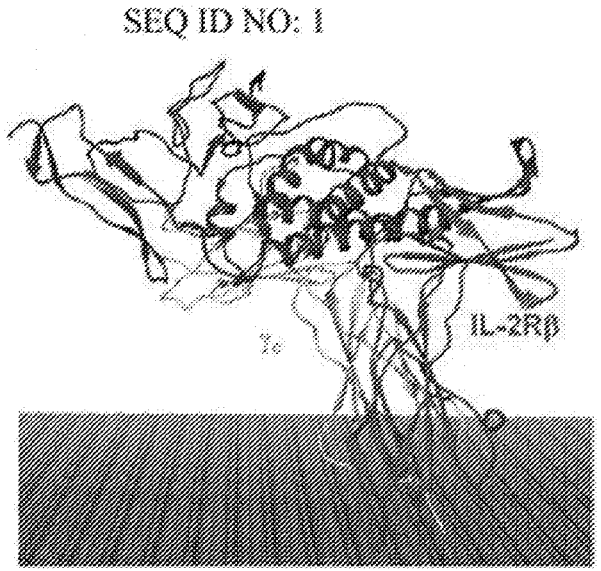
ФИГ.1А



ФИГ.1В

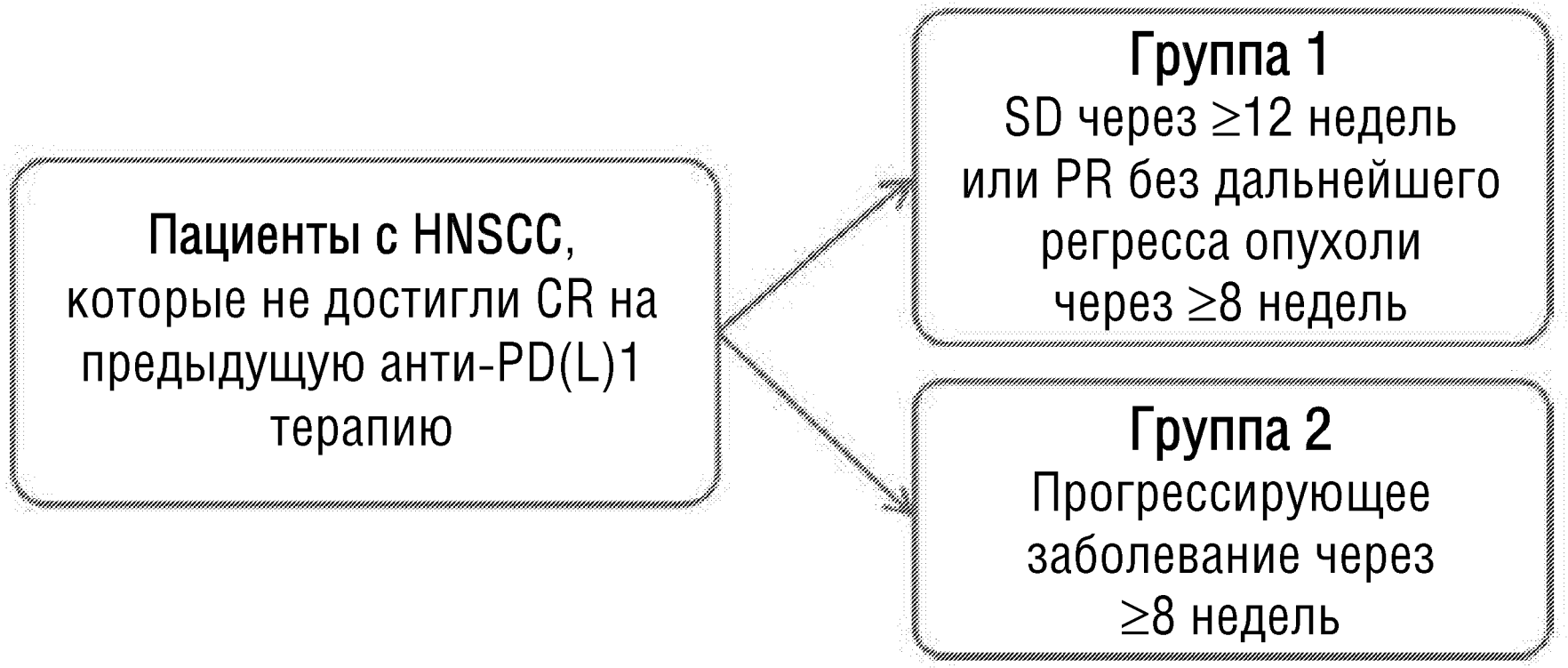


Комплекс IL-2 рецептора
с высокой аффиностью

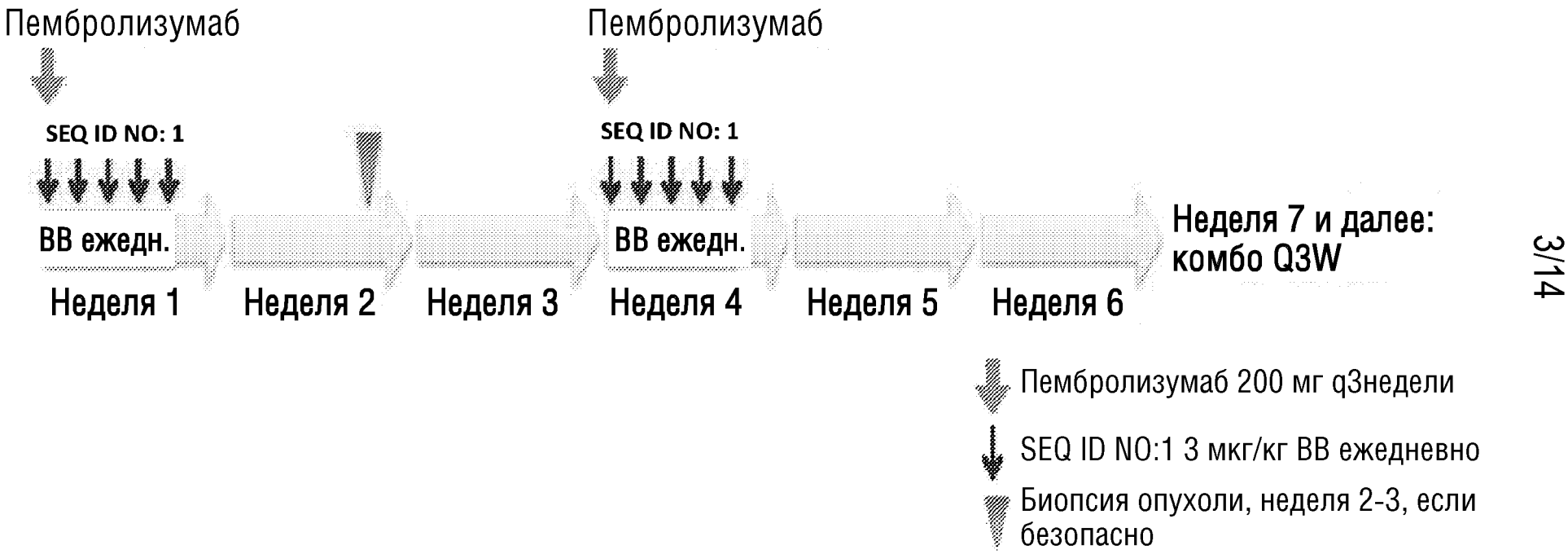


Комплекс IL-2 рецептора
со средней аффиностью

ФИГ.2


Пациенты с HNSCC,
которые не достигли CR на предыдущую анти-PD(L)1 терапию
Группа 1
SD через ≥12 недель или PR без дальнейшего регресса опухоли через ≥8 недель
Группа 2
Прогрессирующее заболевание через ≥8 недель

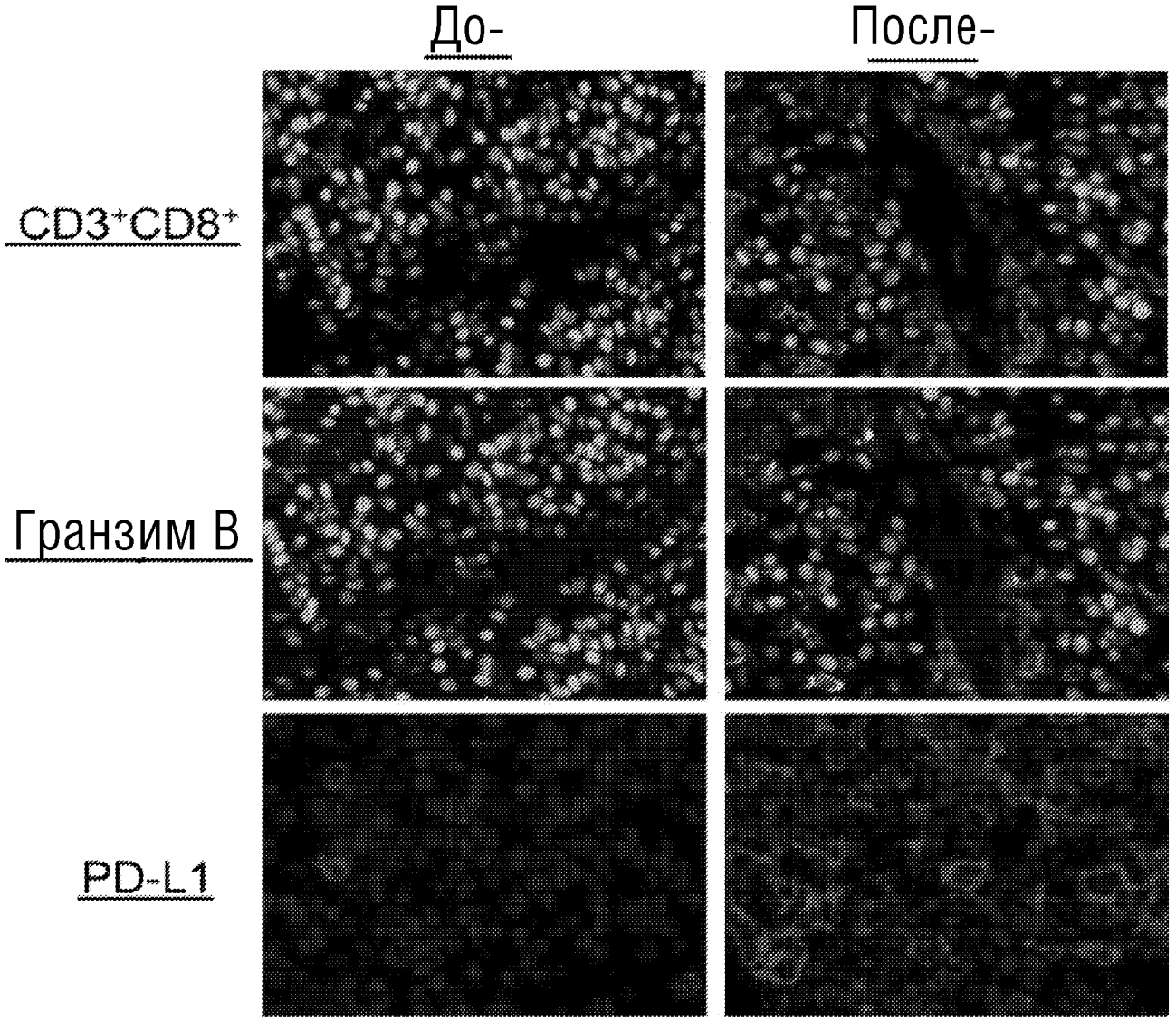
ФИГ.3


Пембролизумаб
SEQ ID NO: 1
ВВ ежедн.
Пембролизумаб
SEQ ID NO: 1
ВВ ежедн.
Неделя 1
Неделя 2
Неделя 3
Неделя 4
Неделя 5
Неделя 6
Неделя 7 и далее: комбо Q3W
Пембролизумаб 200 мг q3недели
SEQ ID NO:1 3 мкг/кг ВВ ежедневно
Биопсия опухоли, неделя 2-3, если безопасно

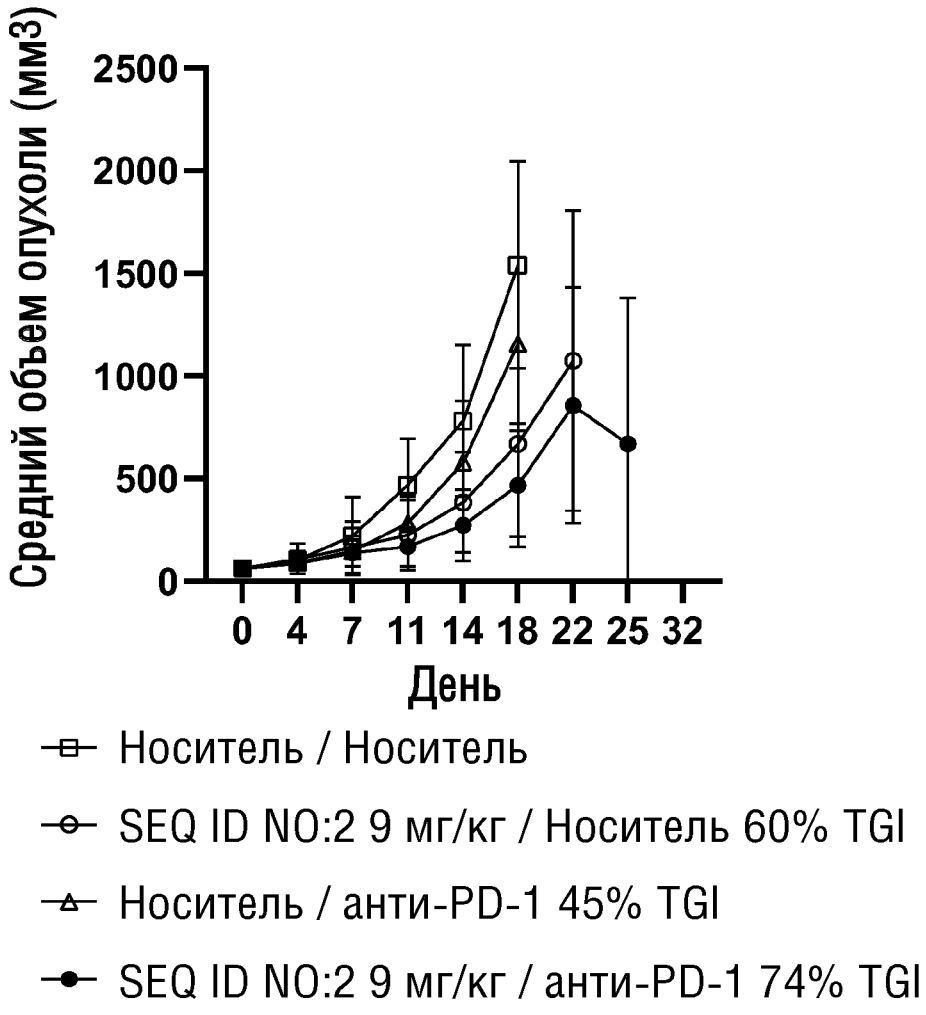
ФИГ.4А

ФИГ.4В

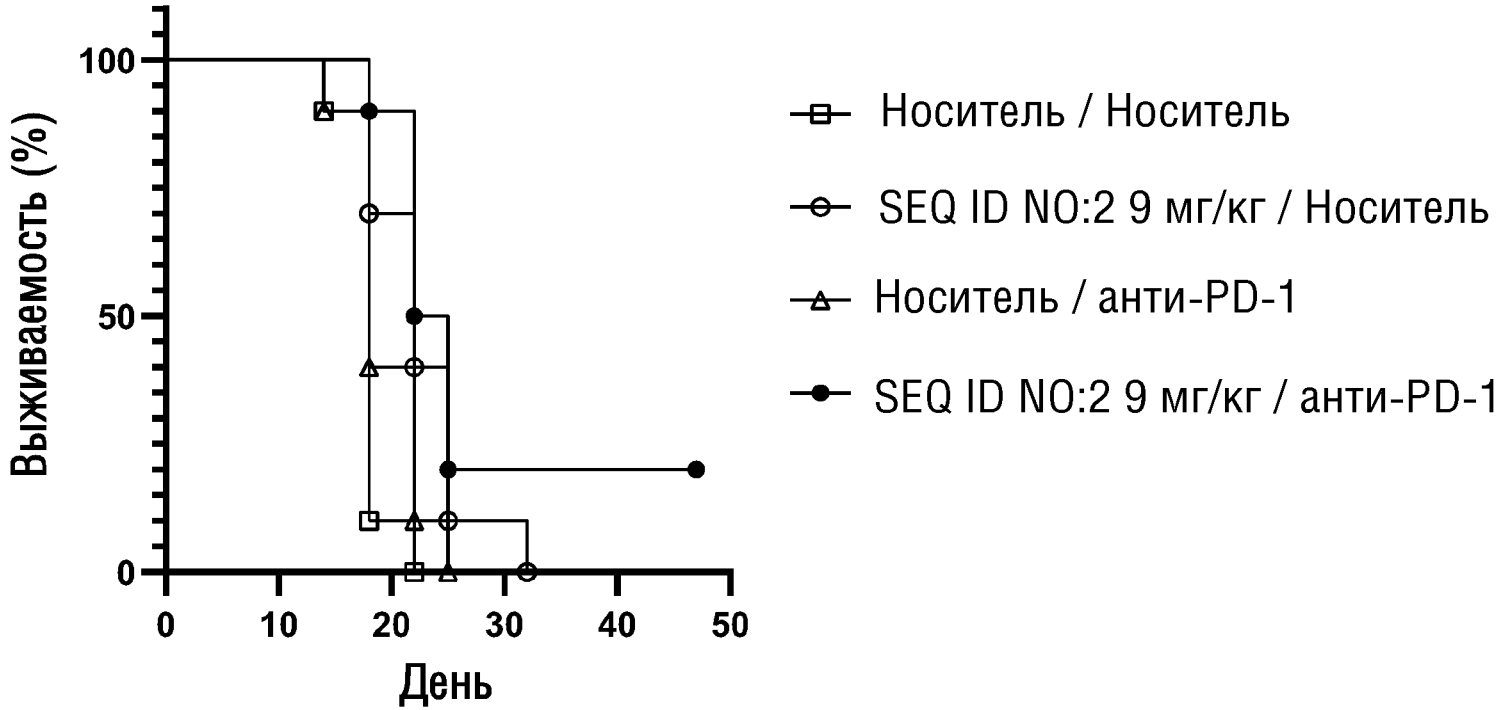
ФИГ.4С



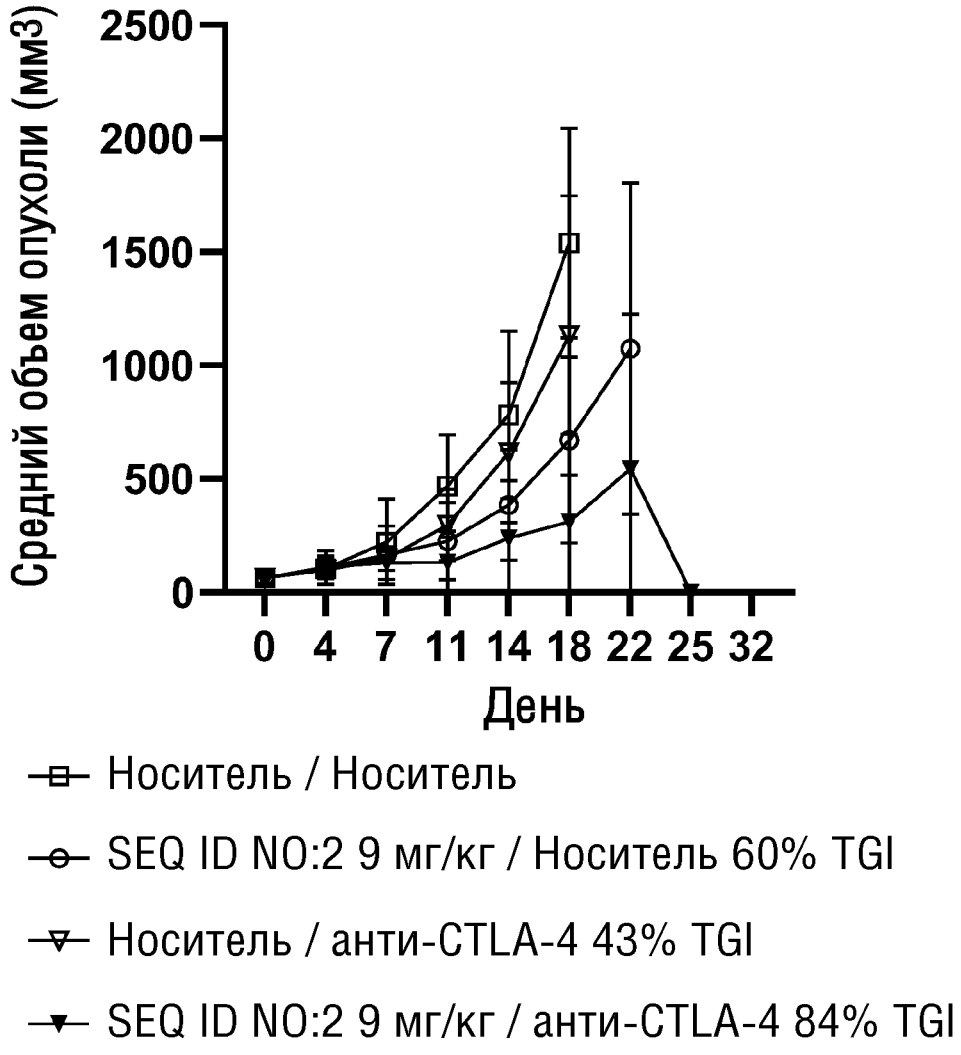
ФИГ.5А


Средний объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 4 7 11 14 18 22 25 32
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель 60% TGI
Носитель / анти-PD-1 45% TGI
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-PD-1 74% TGI

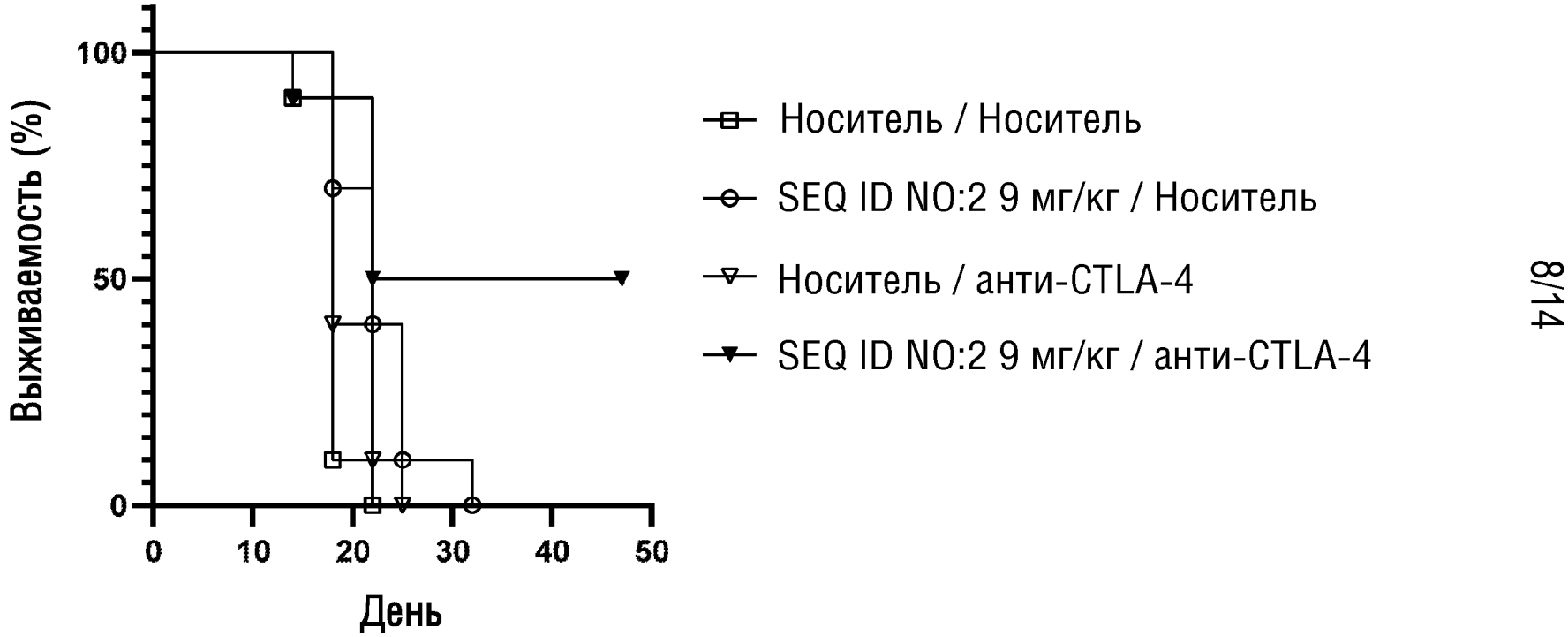
ФИГ.5В


Выживаемость (%)
100
50
0
0
10
20
30
40
50
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель
Носитель / анти-PD-1
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-PD-1

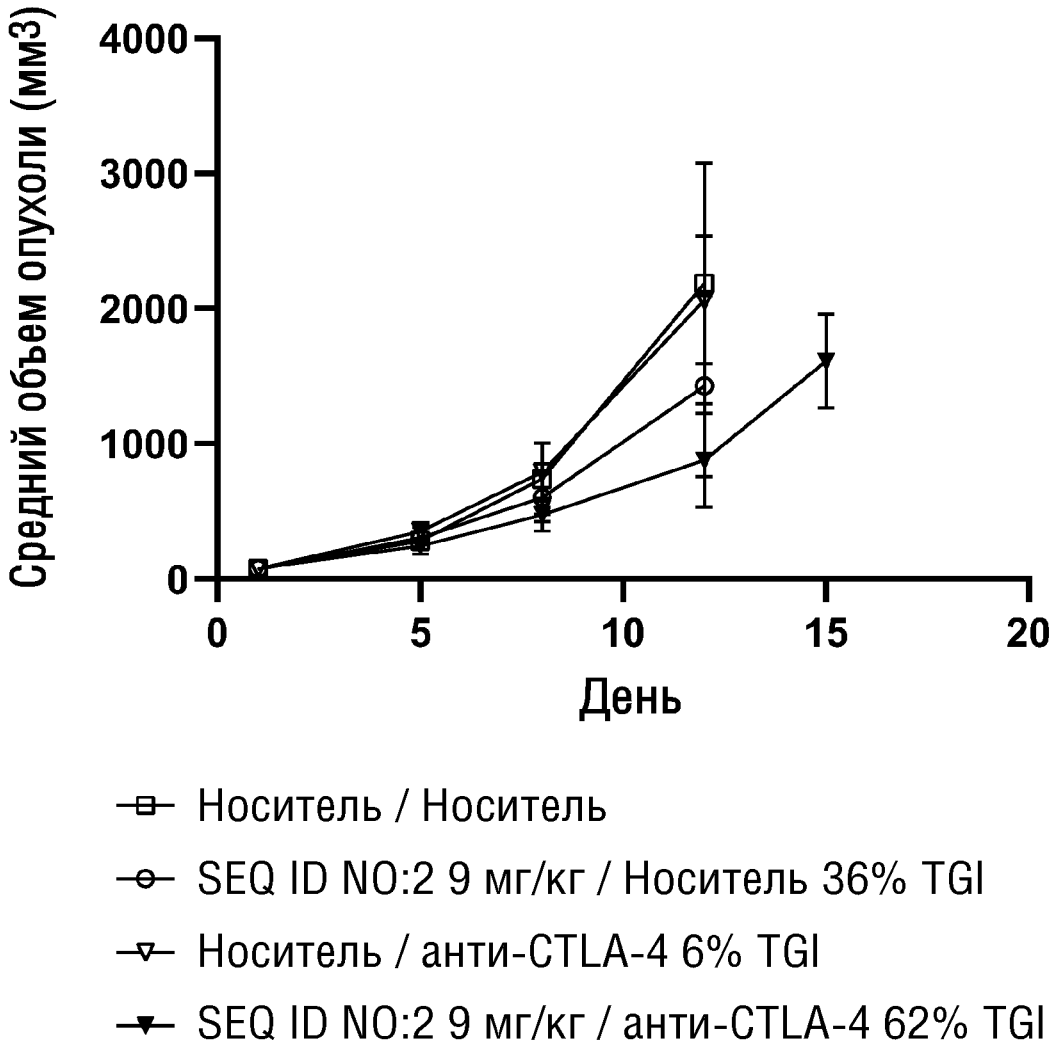
ФИГ.6А


Средний объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 4 7 11 14 18 22 25 32
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель 60% TGI
Носитель / анти-CTLA-4 43% TGI
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-CTLA-4 84% TGI

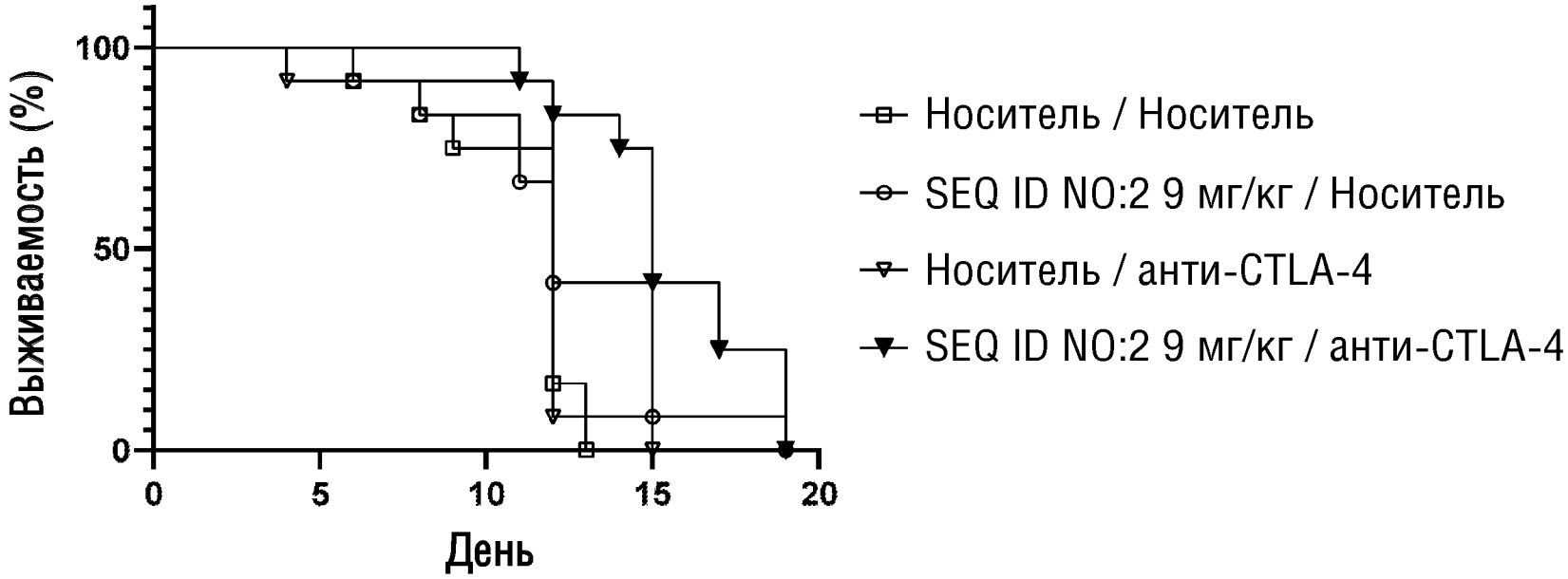
ФИГ.6В


Выживаемость (%)
100
50
0
0
10
20
30
40
50
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель
Носитель / анти-CTLA-4
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-CTLA-4

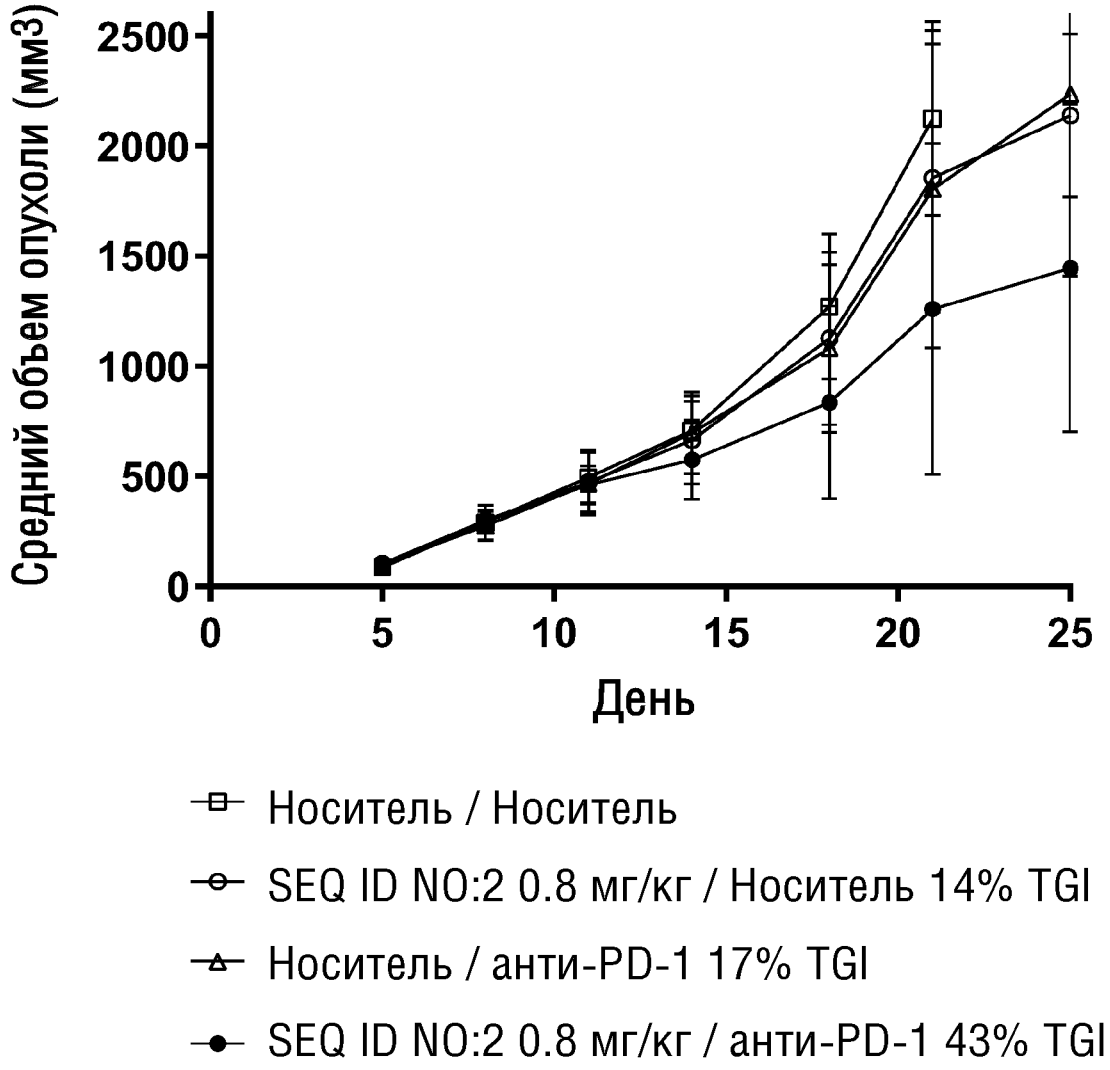
ФИГ.7А


Средний объем опухоли (мм3)
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель 36% TGI
Носитель / анти-CTLA-4 6% TGI
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-CTLA-4 62% TGI

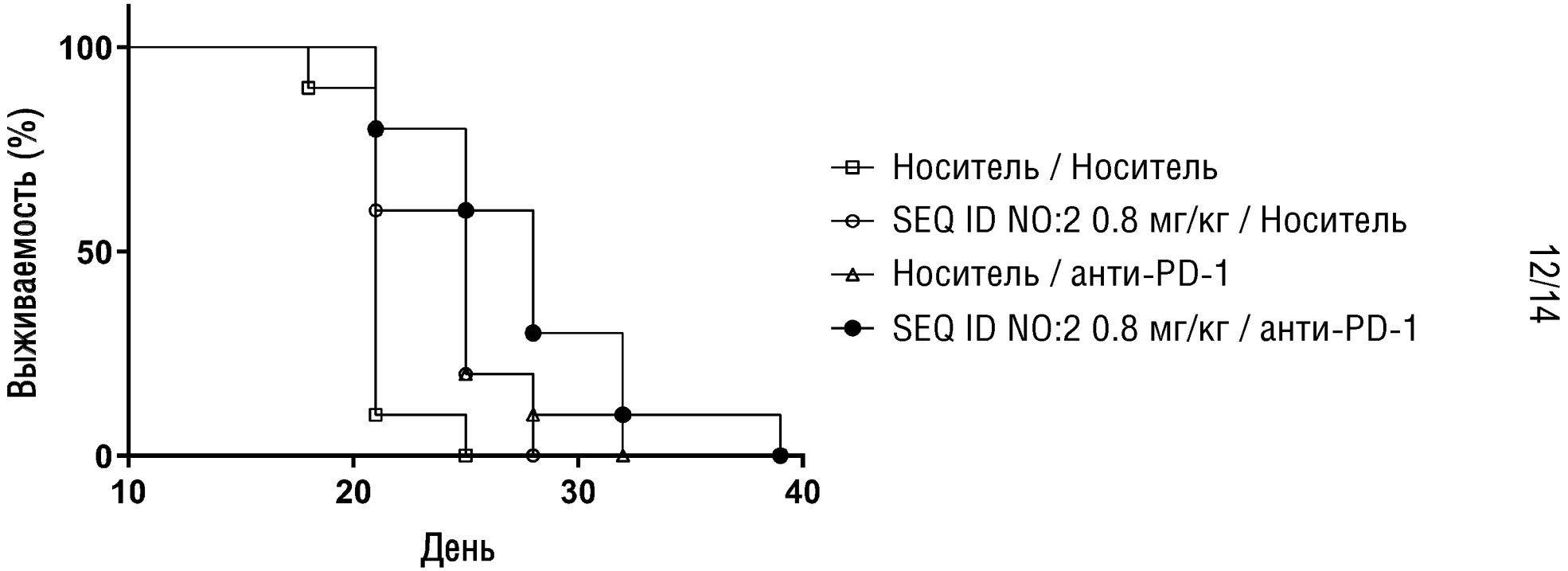
ФИГ.7В


Выживаемость (%)
100
50
0
0
5
10
15
20
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель
Носитель / анти-CTLA-4
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-CTLA-4

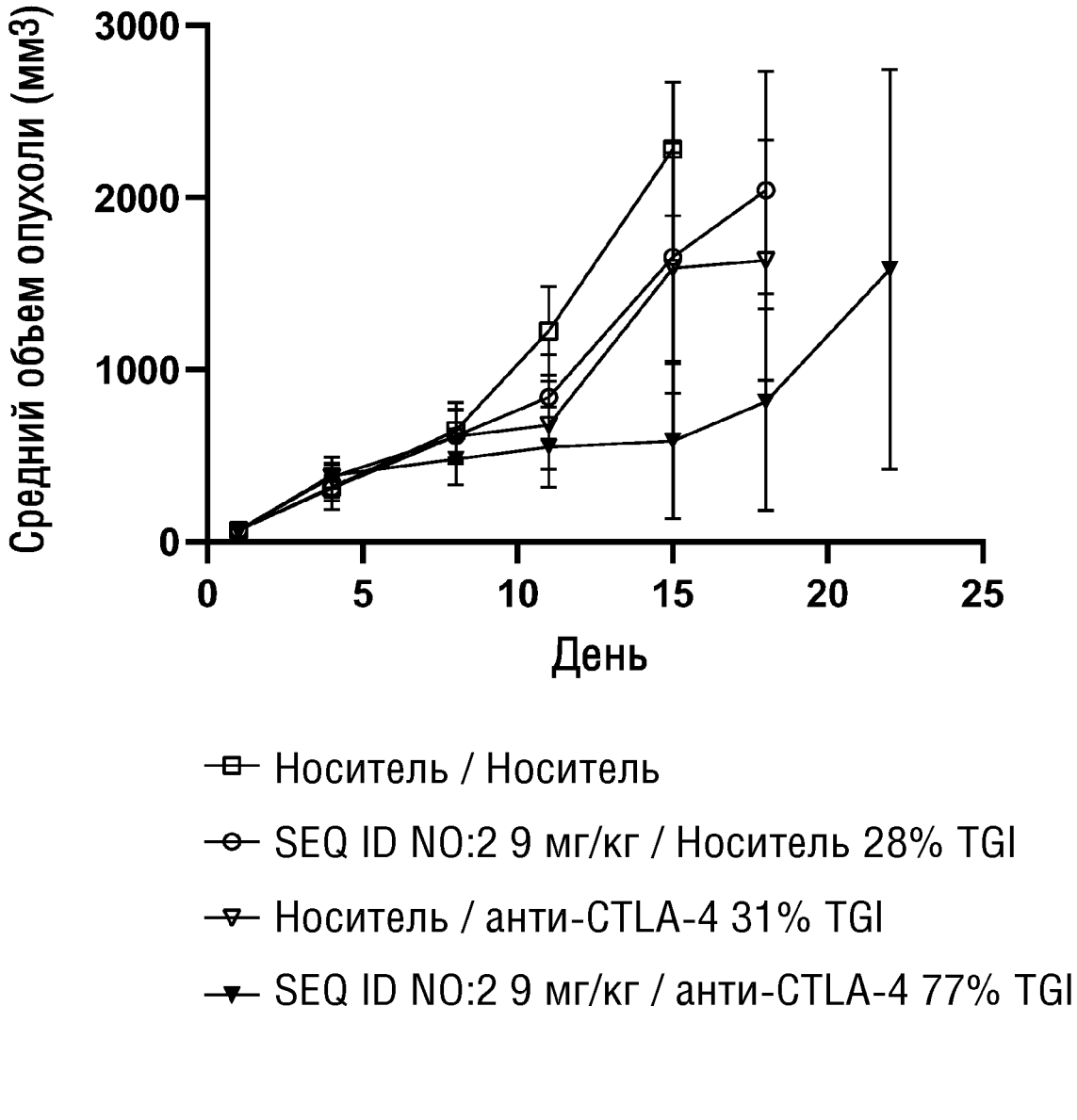
ФИГ.8А


Средний объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 0.8 мг/кг / Носитель 14% TGI
Носитель / анти-PD-1 17% TGI
SEQ ID NO:2 0.8 мг/кг / анти-PD-1 43% TGI

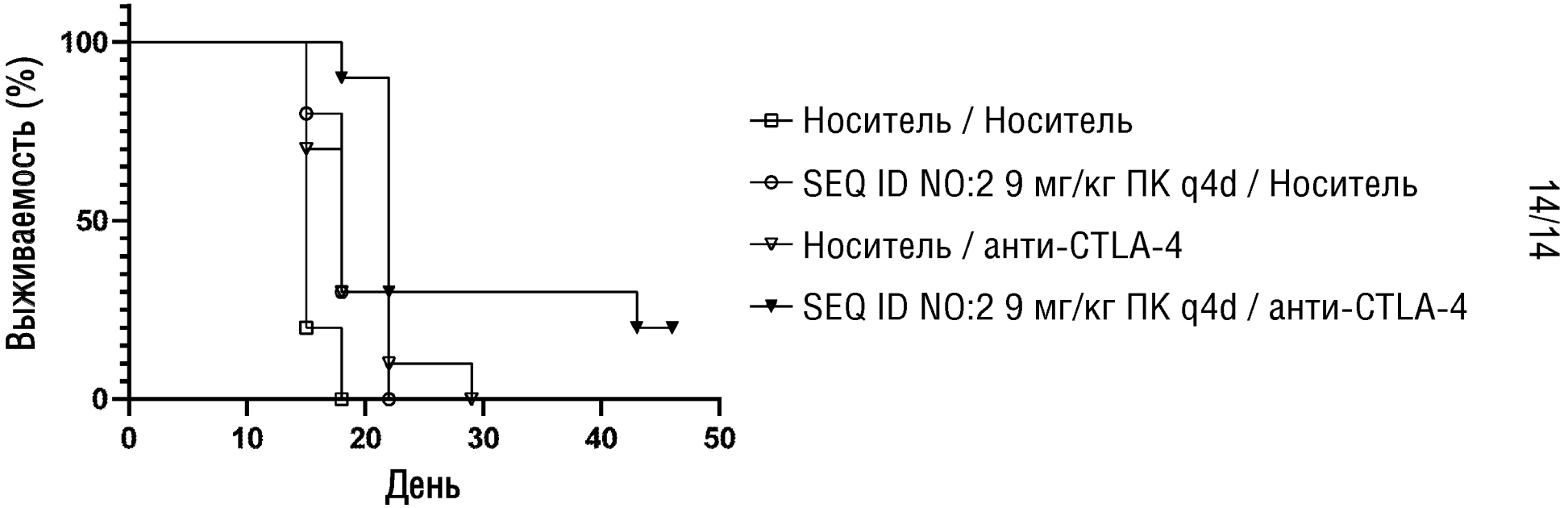
ФИГ.8В


Выживаемость (%)
100
50
0
10
20
30
40
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 0.8 мг/кг / Носитель
Носитель / анти-PD-1
SEQ ID NO:2 0.8 мг/кг / анти-PD-1

ФИГ.9А


Средний объем опухоли (мм3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / Носитель 28% TGI
Носитель / анти-CTLA-4 31% TGI
SEQ ID NO:2 9 мг/кг / анти-CTLA-4 77% TGI

ФИГ.9В


Выживаемость (%)
100
50
0
0
10
20
30
40
50
День
Носитель / Носитель
SEQ ID NO:2 9 мг/кг ПК q4d / Носитель
Носитель / анти-CTLA-4
SEQ ID NO:2 9 мг/кг ПК q4d / анти-CTLA-4