

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292926** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27

(22) Дата подачи заявки
2021.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(54) **ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ АГЕНТЫ В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ
АНГИОГЕНЕЗА**

(31) 63/010,185; 63/165,391

(32) 2020.04.15; 2021.03.24

(33) US

(86) PCT/US2021/027503

(87) WO 2021/211857 2021.10.21

(71) Заявитель:

**АЛКЕРМЕС ФАРМА АЙЭЛЕНД
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

**Лоузи Хезер С., Уинквист Реймонд
Дж., Лопес Джаред (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены композиции и способы лечения рака у пациента с помощью комбинированной терапии, включающей введение пациенту слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза (например, антителом к VEGF или ленватинибом).

202292926
A1

202292926

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576181EA/081

ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ АГЕНТЫ В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ АНГИОГЕНЕЗА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 63/010185, поданной 15 апреля 2020 г., и предварительной заявке США № 63/165391, поданной 24 марта 2021, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Слитый белок с SEQ ID NO: 1 представляет собой слитый белок варианта интерлейкина-2 (IL-2) человека, разработанный для селективного связывания рецептора интерлейкина-2 (IL-2) промежуточной аффинности, IL-2R $\beta\gamma$. Селективность слитого белка с SEQ ID NO: 1 обеспечивается посредством стабильного слияния подвергнутого круговой перестановке (кп) IL-2, слитого с цепью IL-2R α (CD25) рецептора IL-2.

Слитый белок с SEQ ID NO: 1 имеет преимущества по сравнению с нативным IL-2 в качестве терапевтического агента, состоящее в том, что его селективное нацеливание на IL-2R $\beta\gamma$ и его селективная активация приводят к селективной активации подгрупп CD8+ Т-клеток и NK-клеток, которые могут обуславливать противоопухолевые иммунные ответы. Введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 является благоприятным для онкологических больных, поскольку снижает иммуносупрессивные эффекты регуляторных Т-клеток, таких как CD4+ Т-клетки, одновременно повышая уровень CD8+ Т-клеток памяти, тем самым привлекая собственную иммунную систему пациента к устранению раковых клеток. Слитый белок с SEQ ID NO: 1 также демонстрирует длительный эффект после введения, тем самым еще больше улучшая ответ пациента на данное лечение.

Нежелательный или патологический ангиогенез был связан с болезненными состояниями, включая диабетическую ретинопатию, псориаз, рак, ревматоидный артрит и атерому. Ангиогенез опухоли, образование новых кровеносных сосудов и их проницаемость в первую очередь регулируются (опухолевым) фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), который действует по меньшей мере через два разных рецептора: VEGF-R1 (Flt-1) и VEGF-R2 (KDR, Flk-1). Рецептор VEGF KDR является высокоспецифическим в отношении клеток эндотелия сосудов (Endocr. Rev. 1992, 13, 18; FASEB J. 1999, 13, 9).

Многие опухоли человека, особенно глиомы и карциномы, экспрессируют высокие уровни VEGF и его рецепторов. Высокие уровни VEGF также были связаны с иммуносупрессивным микроокружением опухоли и сниженной реактивностью, например, на высокие дозы рекомбинантного IL-2 человека.

Текущая гипотеза заключается в том, что VEGF, высвобождаемый опухолевыми клетками, стимулирует рост кровеносных капилляров и пролиферацию эндотелия опухоли паракринным образом, а также посредством улучшения кровоснабжения ускоряет рост

опухоли. Прямые доказательства роли VEGF как фактора ангиогенеза опухоли *in vivo* показаны в исследованиях, в которых ингибировали экспрессию VEGF или активность VEGF. Это было достигнуто с помощью антител против VEGF, с доминантно-отрицательными мутантами VEGFR-2, которые ингибировали передачу сигнала, и с помощью методик антисмысловой РНК VEGF. Все подходы приводили к снижению роста клеточных линий глиомы или других линий опухолевых клеток *in vivo* в результате ингибированного ангиогенеза опухоли. Однако в ходе клинической разработки ингибиторов ангиогенеза было замечено несколько проблем. Как в доклинических, так и в клинических условиях возникает резистентность к ингибиторам ангиогенеза. У некоторых пациентов лечение ингибитором ангиогенеза приводит к первоначальному ответу, за которым следует прогрессирование опухоли (приобретенная резистентность). У других пациентов наблюдается первичная резистентность.

В последние несколько десятилетий усилия по разработке антиангиогенного лечения главным образом сосредоточены на ингибировании сигнального пути VEGF/VEGFR, например, на бевацизумабе - антителе против VEGF и рамуцизумабе - антителе против VEGFR2. Одноцелевые лекарственные препараты против VEGF/VEGFR часто приводят к кратковременным ответам; однако прогрессирование опухоли происходит из-за того, что другие пути, такие как PDGF/ PDGFR, FGF/FGFR и ANGPT/Tie-2, обеспечивают потенциальные механизмы уклонения. Антиангиогенные агенты, ингибирующие множественные сигнальные пути, кажутся более перспективными; поэтому было разработано множество многоцелевых агентов.

Одним примером соединения, способного ингибировать множественные сигнальные пути, является ленватиниб. Ленватиниб, 4-[3-хлор-4-(циклопропиламинокарбонил)аминофеноксид]-7-метокси-6-хинолинкарбоксамид, или его фармацевтически приемлемая соль (такая как хлористоводородная соль) были разработаны как противоопухолевый агент, также называемый «E7080». Это соединение также описано в патенте США 7253286 как ингибитор ангиогенеза. Ленватиниб является мощным селективным ингибитором тирозинкиназной активности рецепторов фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3 (VEGFR1-3); рецепторов тромбоцитарного фактора роста типов альфа и бета (PDGFR α/β) и рецепторов фактора роста фибробластов типов 1, 2 и 3 (FGFR1-3), которые являются важными киназами для роста, выживания, миграции и ангиогенеза опухоли. За счет нацеливания на эти молекулы ленватиниб обладает потенциалом одновременного ингибирования нескольких путей ангиогенеза, а также сигнальных каскадов, которые приводят к пролиферации клеток.

Сохраняется потребность в комбинированной терапии, которая усиливает и продлевает противоопухолевые иммунные реакции по сравнению с монотерапией и другими видами комбинированной терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложены композиции, способы и схемы комбинированного лечения для лечения рака у пациента путем введения пациенту комбинации слитого белка

с SEQ ID NO: 1 и ингибитора ангиогенеза, такого как ленватиниб или антитело к VEGF.

В одном аспекте в изобретении предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 или его варианта, который является по меньшей мере на 80% (например, на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза; при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

В другом аспекте в изобретении предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 или его варианта, который является по меньшей мере на 80% (например, на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза, выбранного из группы, состоящей из антитела, которое специфически связывается с VEGF, или ленватиниба; при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

В другом аспекте в изобретении предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 или его варианта, который является по меньшей мере на 80% (например, на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ленватиниба; при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

В определенных вариантах осуществления эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 представляет собой количество, эффективное для активации промежуточного рецептора IL-2, IL-2R β .

В определенных вариантах осуществления слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят путем внутривенной или подкожной инъекции.

В определенных вариантах осуществления ингибитор ангиогенеза ингибирует больше чем одну рецепторную тирозинкиназу.

В определенных вариантах осуществления ингибитор ангиогенеза ингибирует одну или более из следующих рецепторных тирозинкиназ: рецепторы фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3; рецепторы тромбоцитарного фактора роста, рецепторы тромбоцитарного фактора роста типов альфа- и бета- и рецепторы фактора роста фибробластов типов 1, 2 и 3.

В определенных вариантах осуществления ленватиниб вводят перорально.

В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, вводят внутривенно.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток в опухолях и селезенке пациента по сравнению с

введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления повышение уровня CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере в 2 раза превышает таковое по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления повышение уровня регуляторных CD4⁺ Т-клеток (T_{reg}) или традиционных CD4⁺ Т-клеток у пациента отсутствует.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток и дендритных клеток в опухолях и селезенке пациента и к снижению уровня опухоль-ассоциированных макрофагов у пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток в опухолях и селезенке пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления повышение уровня CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере в 2 раза превышает таковое по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток и дендритных клеток в опухолях и селезенке пациента и к снижению уровня опухоль-ассоциированных макрофагов у пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления выживаемость без прогрессирования у пациента повышена по меньшей мере на 10% по сравнению с таковой при введении терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению экспрессии генов, связанных с цитотоксической функцией иммунокомпетентных клеток, активацией Т-клеток и презентацией антигена, по

сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к снижению экспрессии Esm1 и повышению экспрессии генов, связанных с интерфероном типа I и интерфероном типа II, по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к изменениям в экспрессии большего общего числа генов по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению экспрессии генов, связанных с цитотоксической функцией иммунокомпетентных клеток, активацией Т-клеток и презентацией антигена, по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии референтной популяции пациентов.

В определенных вариантах осуществления комбинация этапов (i) и (ii) приводит к снижению экспрессии Esm1 и повышению экспрессии генов, связанных с интерфероном типа I и интерфероном типа II, по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии референтной популяции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А - Фиг. 1В иллюстрируют изменения в среднем объеме опухолей (мм^3) (**Фиг. 1А**) и процент выживаемости (**Фиг. 1В**) в течение некоторого количества дней у мышей, которым имплантировали опухолевые клетки MC38 и которых после этого обрабатывали различными дозами SEQ ID NO: 2, мышинового суррогата SEQ ID NO: 1, и/или антитела к VEGF G6-31, описанного в Liang et al. (J. Biol. Chem. 281(2): 951-961. 2006).

Фиг. 2А - Фиг. 2В иллюстрируют изменения в среднем объеме опухолей (мм^3) (**Фиг. 2А**) и процент выживаемости (**Фиг. 2В**) в течение некоторого количества дней у мышей, которым имплантировали опухолевые клетки MC38 и которых после этого обрабатывали различными дозами SEQ ID NO: 2, мышинового суррогата SEQ ID NO: 1, и/или ленватиниба.

Фиг. 3 иллюстрирует изменения экспрессии гена ангиогенеза (Esm1) и иммунной цитолитической активности экспрессии генов (генов гранзима А и перфорина) у мышей,

которым имплантировали опухолевые клетки MC38 и после этого обрабатывали 3 мг/кг SEQ ID NO: 2, мышинового суррогата SEQ ID NO: 1, и/или левватиниба.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимаемые специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут также быть использованы в практике или тестировании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже.

При употреблении в контексте описания данного изобретения и в прилагаемой формуле данного изобретения единственное число включает ссылку на множественное число, если из контекста явным образом не следует иное. Следовательно, например, обозначение «подложка» включает множество подложек. В данном описании и в последующих пунктах формулы данного изобретения будет приведена ссылка на ряд терминов, которые определены как имеющие следующие значения, если явным образом не указано иное. Также отмечается, что термин «включающий» предназначен для того, чтобы быть открытым и допускать включения дополнительных элементов или этапов, но не требует этого. Следовательно, в тех случаях, когда в данном документе употребляется термин «включающий», также охватываются и описываются термины «содержащий» и «состоящий из».

Следует отметить, что соотношения, концентрации, количества и другие числовые данные могут быть выражены в данном документе в формате диапазона. Следует понимать, что такой формат диапазона используется для удобства и краткости, и должен интерпретироваться гибко для включения не только числовых значений, явным образом указанных как пределы данного диапазона, но и для включения всех отдельных числовых значений или поддиапазонов в пределах данного диапазона, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон указывались явным образом. В качестве примера, диапазон концентраций «от около 0,1% до около 5%» следует интерпретировать как включающий не только явно указанную концентрацию от около 0,1 мас.% до около 5 мас.%, но также как включающий индивидуальные концентрации (например, 1%, 2%, 3% и 4%), а также поддиапазоны (например, 0,5%, 1,1%, 2,2%, 3,3% и 4,4%) в пределах указанного диапазона. Термин «около» может включать $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 7\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$ или $\pm 10\%$, или больше от изменяемого(ых) числового(ых) значения(й). Кроме того, фраза «от около 'x' до 'y'» включает «от около 'x' до около 'y'».

При употреблении в контексте данного документа термин «белок» или «пептид» относится к по меньшей мере двум или большему числу аминокислотных остатков, связанным вместе пептидной связью. Аминокислотная последовательность в белке или пептиде показана в стандартном формате, т. е. от аминоконца (N-конец) до карбоксильного конца (C-конец).

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

«Слитый белок с SEQ ID NO: 1» также называется в данном документе «срIL-2:IL-2R α » и описан в публикации заявки PCT № WO 2013/184942. Слитый белок с SEQ ID NO: 1 представляет собой подвергшийся круговой перестановке (кп) вариант IL-2, слитый с внеклеточным доменом участка IL-2R α рецептора IL-2, и имеет следующую последовательность:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL
TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHQLQCL
EEELKPLEEVLNLAQGGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIK
SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD
QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK
TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1).

В изобретении также предусмотрено применение «варианта» слитого белка SEQ ID NO: 1, имеющего аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности, которая составляет 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, на протяжении непрерывного участка от около 20 аминокислот до полной длины SEQ ID NO: 1. Вариант SEQ ID NO: 1 может иметь определенную идентичность последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 1 на протяжении определенной длины непрерывного участка аминокислот (например, «окна сравнения»). Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью метода поиска подобия по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Madison, Wis.) или с помощью выравнивания вручную или визуальной оценки (смотрите, например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

в качестве примера вариант слитого белка с SEQ ID NO: 1 может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75%, по

меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности аминокислотной последовательности с непрерывным участком SEQ ID NO: 1 от около 20 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 60 аминокислот, от около 60 аминокислот до около 80 аминокислот, от около 80 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 120 аминокислот, от около 120 аминокислот до около 140 аминокислот, от около 140 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 155 аминокислот, от около 155 аминокислот до полной длины SEQ ID NO: 1.

Термин «терапия IL-2» включает в себя применение иммунотерапии на основе IL-2 и связанных с этим биологических функций в качестве иммунотерапии, включительно с, но не ограничиваясь этим, поддержанием регуляторных CD4⁺ Т-клеток и дифференцировкой CD4⁺ Т-клеток в различные субпопуляции; стимулированием цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток, и модуляцией программ дифференцировки Т-клеток в ответ на антиген, стимулированием дифференцировки наивных CD4⁺ Т-клеток в Т-хелперы-1 (Th1) и Т-хелперы-2 (Th2), одновременно ингибируя дифференцировку Т-хелперов-17 (Th17). Следовательно, термин «терапия IL-2» в контексте данного документа включает, но не ограничивается этим, иммунотерапию rhIL-2 или вариантом rhIL-2, таким как слитый белок с SEQ ID NO: 1.

Термины «высокая доза IL-2» и «ВД IL-2» включают дозу предпочтительно рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2) человека, составляющую около или по меньшей мере около 600000 международных единиц (МЕ)/кг массы тела (кг)/доза или около, или по меньшей мере около, 720000 МЕ/кг/доза.

При употреблении в контексте данного документа термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, которому можно вводить композицию в соответствии с настоящим изобретением, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Иллюстративные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и люди) и/или растения. Предпочтительно термин «пациент» относится к субъекту-человеку, который может обратиться за лечением или нуждается в лечении, требует лечение, получает лечение, получит лечение, или субъекту, который находится под наблюдением квалифицированного специалиста в отношении конкретного заболевания или патологического состояния.

Фраза «фармацевтически приемлемый» употребляется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримо с разумным соотношением польза/риск.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к разбавителю,

адьюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят соединение по изобретению. Фармацевтически приемлемый эксципиент, как правило, представляет собой вещество, которое является нетоксичным, биологически переносимым и иным образом биологически пригодным для введения субъекту, такое как инертное вещество, добавляемое в фармакологическую композицию или иным образом используемое в качестве несущей среды, носителя или разбавителя для облегчения введения агента и которое совместимо с ним. Примеры эксципиентов включают воду, любые и все растворители, дисперсные среды, разбавители или другие жидкие несущие среды, вспомогательные вещества для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные вещества, изотонические агенты, загустители или эмульгирующие агенты, консерванты, твердые связующие агенты, смазывающие агенты и тому подобное, в зависимости от конкретной желаемой лекарственной формы. В работе Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; включена в данный документ посредством ссылки) описаны различные эксципиенты, используемые при составлении фармацевтических композиций, и известные способы их получения. Применение любой стандартной вспомогательной среды охватывается объемом данного изобретения, за исключением того, что любая стандартная вспомогательная среда может быть несовместима с веществом или его производными, например, вызывая любой нежелательный биологический эффект или иным вредным образом взаимодействуя с любым (-и) другим (-и) компонентом (-ами) фармацевтической композиции.

При употреблении в контексте данного документа термин «предупредить» относится к частичной или полной отсрочке начала инфекции, заболевания, нарушения и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или большего числа симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или большего числа симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования конкретной инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния, и/или снижению риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, нарушением и/или патологическим состоянием.

Термин «рекомбинантное получение» относится к методикам обработки и объединения двух или большего числа последовательностей ДНК вместе, которые включают рекомбинацию, ПЦР (полимеразную цепную реакцию), мутагенез *in vitro* и прямой синтез ДНК. Такие методики описаны в многочисленных опубликованных книгах и руководствах, включая “Current protocols in molecular biology” (Ausubel eds. 2008. John Wiley & Son).

При употреблении в контексте данного документа любая форма применения или совместного применения «комбинации», «комбинированной терапии» и/или «схемы

комбинированной терапии» относится к по меньшей мере двум терапевтически активным лекарственным препаратам или композициям, которые можно вводить или совместно вводить одновременно, в отдельных или комбинированных фармацевтических составах, или последовательно в разные моменты времени, разделенные минутами, часами или сутками, но которые каким-то образом действуют вместе, чтобы обеспечить желаемый терапевтический ответ.

При употреблении в контексте данного документа термин «парентеральный» относится к лекарственным формам, которые предназначены для введения в виде инъекции или инфузии, включительно с подкожной, внутривенной, внутриаартериальной, внутрибрюшинной, внутрисердечной, интратекальной и внутримышечной инъекциями, а также инфузионными инъекциями, как правило вводимыми внутривенным путем.

Термин «терапевтический агент» включает любой агент, вводимый для лечения симптома или заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Такой дополнительный терапевтический агент может содержать любые активные ингредиенты, подходящие для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно - те, которые обладают дополняющей активностью и не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Предпочтительно дополнительный терапевтический агент представляет собой противовоспалительный агент.

Термин «химиотерапевтический агент» относится к соединению или его производному, которое может взаимодействовать с раковой клеткой, тем самым снижая пролиферативный статус указанной клетки и/или убивая указанную клетку, например, путем нарушения клеточного деления или синтеза ДНК, или путем повреждения ДНК, эффективно воздействуя на быстро делящиеся клетки. Примеры химиотерапевтических агентов включают следующие, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ифосфамид); метаболические антагонисты (например, метотрексат (MTX), 5-фторурацил или их производные); замещенный нуклеотид; замещенный нуклеозид; агенты, деметилирующие ДНК (также известные как антиметаболиты; например, азацитидин); противоопухолевые антибиотики (например, митомицин, адриамицин); противоопухолевые агенты растительного происхождения (например, винкристин, виндезин, ТАКСОЛ®, паклитаксел, абраксан); цисплатин; карбоплатин; этопозид; и тому подобное. Такие агенты могут дополнительно включать, но не ограничиваться ими, следующие противораковые агенты: триметотрексат (TMTX); темозоломид; ралтитрексед; S-(4-нитробензил)-6-тиоинозин (NBMPR); 6-бензигуанидин (6-BG); нитрозомочевину, нитрозомочевины (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 патологического состояния, или нарушения) при употреблении в контексте данного документа относятся к

предотвращению возникновения данного заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, которые могут быть предрасположены к данному заболеванию, но еще не испытывают или не проявляют симптомы данного заболевания (профилактическое лечение), подавлению данного заболевания (замедлению или остановке его развития), облегчению симптомов или побочных эффектов данного заболевания (включительно с паллиативным лечением) и вызывание регресса данного заболевания. Что касается онкологических заболеваний, данные термины также означают, что ожидаемая продолжительность жизни субъекта, имеющего онкологическое заболевание, может быть увеличена, или что один или большее число симптомов данного заболевания будут уменьшены. Что касается онкологических заболеваний, «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 в составе фармацевтической композиции, и либо в разовой дозе, либо в составе серии доз, в количестве, способном оказывать любое обнаруживаемое положительное воздействие на любой симптом, аспект или характеристику заболевания, нарушения или патологического состояния при введении субъекту. Терапевтически эффективное количество можно устанавливать путем измерения соответствующих физиологических эффектов, и его можно корректировать в связи со схемой введения доз и диагностическим анализом состояния субъекта, и т. п. В качестве примера, измерение количества воспалительных цитокинов, продуцируемых после введения, может указывать на то, было ли использовано терапевтически эффективное количество. В отношении онкологических заболеваний или патологий, связанных с нерегулируемым делением клеток, терапевтически эффективное количество относится к тому количеству, которое оказывает эффект (1) уменьшения размера опухоли (т. е. регресса опухоли), (2) ингибирования (то есть замедления до некоторой степени, предпочтительно - остановки) аномального деления клеток, например, деления раковых клеток, (3) предотвращения или уменьшения метастазирования раковых клеток и/или (4) облегчения до некоторой степени (или, предпочтительно, устранения) одного или большего числа симптомов, связанных с патологией, связанной с нерегулируемым или аномальным делением клеток, или частично вызванной им, включительно, например, с онкологическим заболеванием. «Эффективное количество» также представляет собой то количество, которое приводит к желательным профилям фармакодинамики (ФД) и фармакокинетики (ФК), и желательному профилированию иммунокомпетентных клеток при введении терапевтически активных композиций по изобретению.

Термин «терапевтически активное количество» в конкретном контексте введения слитого белка с SEQ ID NO: 1 пациенту включает, но не ограничивается этим, количество слитого белка SEQ ID NO: 1, которое представляет собой количество, эффективное для активации промежуточного рецептора IL-2, IL-2R $\beta\gamma$.

Термин «терапевтически эффективное количество» в конкретном контексте введения пациенту ингибитора ангиогенеза, такого как ленватиниб, включает, но не

ограничивается этим, количество ингибитора ангиогенеза, эффективное для ингибирования активности одной или более проангиогенных рецепторных тирозинкиназ, включая, но не ограничиваясь этим, рецепторы фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3 (VEGFR1-3); рецепторы тромбоцитарного фактора роста типов альфа и бета (PDGFR α/β) и рецепторы фактора роста фибробластов типов 1, 2 и 3 (FGFR1-3).

«Выживаемость без прогрессирования» (ВБП, англ. «PFS») при употреблении в контексте видов онкологических заболеваний, описанных в данном документе, относится к продолжительности периода времени во время и после лечения онкологического заболевания, в течение которого рост опухоли останавливается, уменьшается, или опухоль полностью устраняется, до момента, когда опухоль возобновляет рост, наблюдается прогрессирование опухоли или появляются другие опухоли, или до момента смерти пациента от любой причины. Лечение можно оценивать на основании объективных или субъективных параметров, включительно с результатами врачебного осмотра, неврологического обследования или психиатрической экспертизы. В предпочтительных аспектах ВБП можно оценивать с помощью заслепленной централизованной оценки визуализации и можно дополнительно подтверждать общей частотой ответа (ОЧО, англ. «ORR») или независимой централизованной оценкой в слепом режиме (англ. «BICR»). Увеличение ВБП можно определять на основе сравнения, например, с одним или большим числом других пациентов, не получающих комбинированную терапию по изобретению, или с одним или большим числом пациентов, получающих только один лекарственный препарат комбинированной терапии, т. е. монотерапию, и можно выражать в виде среднего процентного показателя. Указанный определенный период времени можно сравнивать между схемами лечения, например, можно выполнять сравнение между комбинированной терапией по изобретению и монотерапией с использованием только одного из компонентов комбинированной терапии. Также можно выполнять сравнения между комбинированной терапией одними и теми же или разными ингибиторами ангиогенеза и, например, высокой дозой рекомбинантного IL-2 человека.

«Общую выживаемость (ОВ)» можно оценивать по частоте ОВ в определенные моменты времени (например, 1 год и 2 года) способом Каплана - Мейера, и соответствующий 95%-й ДИ рассчитывать на основе формулы Гринвуда путем изучения лечения для каждого типа опухоли. Частота ОВ определяется как доля участников, которые живы на определенный момент времени. ОВ для субъекта определяют как время с даты введения первой дозы до даты смерти по любой причине. Указанный определенный период времени можно сравнивать между схемами лечения, например, можно выполнять сравнение между комбинированной терапией по изобретению и монотерапией с использованием только одного из компонентов комбинированной терапии. Также можно выполнять сравнения между комбинированной терапией одними и теми же или разными ингибиторами ангиогенеза и, например, высокой дозой рекомбинантного IL-2 человека.

При употреблении в контексте данного документа термин «полный ответ», или

«ПО», означает исчезновение всех признаков онкологического заболевания в ответ на лечение. Полный ответ может также упоминаться в данном документе как «тотальная ремиссия» или «полная ремиссия». Термин «полный ответ» включает, но не ограничивается этим, определение полного ответа, который достигается в течение определенного периода времени. Указанный определенный период времени можно сравнивать между схемами лечения, например, можно выполнять сравнение между комбинированной терапией по изобретению и монотерапией с использованием только одного из компонентов комбинированной терапии. Также можно выполнять сравнения между комбинированной терапией одними и теми же или разными ингибиторами ангиогенеза и, например, референсными группами пациентов, и, например, высокой дозой рекомбинантного IL-2 человека.

При употреблении в контексте данного документа термин «частичный ответ» (ЧО) означает уменьшение размера опухоли или степени распространения рака в организме в ответ на лечение. Частичный ответ может также упоминаться в данном документе как «частичная ремиссия». Термин «частичный ответ» включает, но не ограничивается этим, определение частичного ответа, который достигается в течение определенного периода времени. Указанный определенный период времени можно сравнивать между схемами лечения в референсных группах пациентов, например, можно выполнять сравнение между комбинированной терапией по изобретению и монотерапией с использованием только одного из компонентов комбинированной терапии. Также можно выполнять сравнения между комбинированной терапией одними и теми же или разными ингибиторами ангиогенеза и, например, высокой дозой рекомбинантного IL-2 человека.

При употреблении в контексте данного документа термин «онкологическое заболевание», или «рак», имеет стандартное значение общего термина, обозначающего заболевания, при которых не соответствующие норме клетки делятся бесконтрольно.

При употреблении в контексте данного документа термин «уменьшение опухоли», или «регресс опухоли», относится к уменьшению размера или объема опухолевой массы, уменьшению числа метастазированных опухолей у субъекта, снижению пролиферативного статуса раковых клеток (степени размножения раковых клеток), и тому подобное.

При употреблении в контексте данного документа термины «усиленный», «повышенный» или «увеличенный» в контексте реакции пациента на комбинированную терапию по изобретению относятся к улучшению любого аспекта реакции пациента на лечение комбинированной терапией, описанной в данном документе, включительно со следующим, но не ограничиваясь им: усиленное снижение размер опухоли, увеличенная ВБП, повышенный ПО и увеличенная ОВ по сравнению с референсным ответом. Например, усиленный или повышенный ответ может включать увеличение степени ответа 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 большее число процентов, по сравнению с референсным ответом. Референсным ответом может быть, например, ответ пациента или

популяции пациентов на монотерапию с использованием только одного из компонентов комбинированной терапии. Также можно определять другой референсный ответ, например, при комбинированной терапии одними и теми же или разными ингибиторами ангиогенеза и, например, высокой дозой рекомбинантного IL-2 человека у пациента или популяции пациентов.

В контексте данного документа «увеличение» и «повышение» также может относиться к увеличению или повышению числа субъектов, которые отвечают на лечение, такое как комбинированная терапия, включающая слитый белок с SEQ ID NO: 1 и одно или более из следующего: ингибиторы ангиогенеза, химиотерапия, иммунокомпетентные клетки с лекарственной резистентностью и ингибиторы иммунных контрольных точек. Например, усиленный или повышенный ответ может означать общее процентное содержание субъектов, которые отвечают на лечение, при этом процентное содержание 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 большее число процентов.

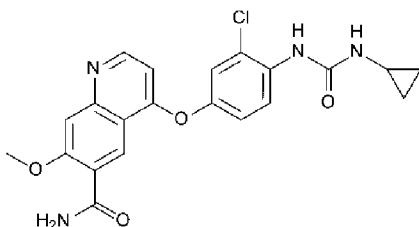
«Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли соединения по изобретению, которая является фармацевтически приемлемой и которая обладает желаемой фармакологической активностью родительского соединения. В частности, такие соли нетоксичны, могут быть солями присоединения неорганических или органических кислот и солями присоединения оснований. В частности, такие соли включают: (1) соли присоединения кислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и подобными; или образованные с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, пропионовая кислота, гексановая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, 3-(4-гидроксibenзоил)бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-этандисульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, 4-хлорбензолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-толуолсульфоновая кислота, камфорсульфоновая кислота, 4-метилбицикло[2.2.2]-окт-2-ен-1-карбоновая кислота, глюкогептоновая кислота, 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, третичная бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтойная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, муконовая кислота и подобными; или (2) соли, образованные когда кислый протон, присутствующий в родительском соединении, либо замещается ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом щелочноземельного металла или ионом алюминия; либо координируется с таким органическим основанием, как этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, N-метилглюкамин и подобными. Соли дополнительно включают, исключительно в качестве примера, соли натрия, калия, кальция, магния, аммония,

тетраалкиламмония и подобные; и, когда соединение имеет основную функциональность, соли нетоксичных органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, тартрат, мезилат, ацетат, малеат, оксалат и тому подобное.

Как правило, такие соли можно получать взаимодействием форм данных соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Перечни подходящих солей можно найти в Allen, Jr., L. V., ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, London, UK (2012).

При употреблении в контексте данного документа термин «ингибитор ангиогенеза» относится к лекарственному препарату, соединению, антителу или другому агенту, который препятствует образованию новых кровеносных сосудов. При лечении онкологического заболевания ингибиторы ангиогенеза могут предотвращать рост новых кровеносных сосудов, необходимых опухолям для роста. Ингибиторы ангиогенеза включают те агенты, которые могут воздействовать на один или большее число сигнальных путей, связанных с рецепторными тирозинкиназами (RTK). RTK включают, но не ограничиваются ими, рецепторы фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3 (VEGFR1-3); рецепторы тромбоцитарного фактора роста типов альфа и бета (PDGFR α/β) и рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR) типов 1, 2 и 3 (FGFR1-3). Предпочтительные ингибиторы ангиогенеза в соответствии с данным изобретением обладают широкой селективностью по отношению к мишеням и способны к одновременному нацеленному ингибированию множественных RTK, и указаны в данном документе как «ингибиторы множественных рецепторных тирозинкиназ».

Одним предпочтительным ингибитором рецепторных тирозинкиназ является ленватиниб, 4-[3-хлор-4-(циклопропиламинокарбонил)аминофенокси]-7-метокси-6-хинолинкарбоксамид (CAS № 417716-92-8), или его фармацевтически приемлемая соль (такая как хлористоводородная соль). Ленватиниб более подробно описан в патенте США 7253286, включенном в данный документ посредством ссылки. Ленватиниб представлен формулой I:



Формула I

«Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)» представляет собой сигнальный белок, участвующий в регуляции ангиогенеза и васкулогенеза. VEGF связывается с рецепторной тирозинкиназой VEGFR и активирует ее посредством трансфосфорилирования. У человека идентифицированы три изоформы VEGFR.

Ингибиторы «фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) / рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR)» представляют собой агенты, которые ингибируют активность VEGF и VEGFR. Передача сигналов, связанная с VEGF и VEGFR (рецептор тирозинкиназы), модулирует ангиогенез, который включает создание новых кровеносных сосудов из существующих кровеносных сосудов. Известно, что аномальный ангиогенез возникает при онкологических заболеваниях, дегенеративных заболеваниях глаз и других патологических состояниях, связанных с воспалением. В качестве ингибиторов VEGF можно применять специфические моноклональные антитела, а в качестве ингибиторов VEGFR применяют конкретные ингибиторы тирозинкиназ. Ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) / рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) применяют для лечения различных видов онкологических заболеваний.

«Ингибитор VEGFR-тирозинкиназы» представляет собой соединение, которое блокирует фермент, необходимый для формирования кровеносных сосудов. Его также называют «ингибитором тирозинкиназы рецептора фактора роста эндотелия сосудов». Ленватиниб является ингибитором VEGFR-тирозинкиназы.

«Рецептор FGF» относится к группе рецепторных тирозинкиназ. В данном изобретении FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 и FGFR5 в совокупности указаны как «рецептор FGF». Кроме того, «рецептор FGF» также включает соединение, которое имеет гомологию с аминокислотной последовательностью любого из FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 и FGFR5, и обладает активностью рецептора FGF (включительно с рецептором, функция которого в настоящее время остается неизвестной, но будет классифицирована в этом же семействе в будущем). Активность рецептора FGF можно определять путем выявления фосфорилирования данного рецептора с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, англ. «ELISA») или вестерн-блоттинга.

«Ингибитор рецептора FGF» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении рецептора FGF. Ингибитор рецептора FGF может обладать ингибирующей активностью в отношении других рецепторных тирозинкиназ и других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении рецептора FGF.

«Рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF)» относится к группе рецепторных тирозинкиназ. В данном изобретении PDGFR- α и PDGFR- β в совокупности указаны как «рецептор PDGF». Кроме того, «рецептор PDGF» также включает соединение, которое имеет гомологию с аминокислотной последовательностью любого из PDGFR- α и PDGFR- β , и обладает активностью рецептора PDGF (включительно с рецептором, функция которого в настоящее время остается неизвестной, но будет классифицирована в этом же семействе в будущем). Активность рецептора PDGF можно определять путем выявления активности фосфорилирования данного рецептора с помощью ТИФА или вестерн-блоттинга.

«Ингибитор рецептора PDGF» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении рецептора PDGF. Ингибитор рецептора PDGF

может обладать ингибирующей активностью в отношении других рецепторных тирозинкиназ и других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении рецептора PDGF.

«RET-киназа», которая принадлежит к группе рецепторных тирозинкиназ, представляет собой функциональный рецептор для лиганда, принадлежащего к семейству нейротропного фактора, полученного из глиальной клеточной линии (GDNF). Кроме того, в данном изобретении «RET-киназа» также включает соединение, которое имеет гомологию с аминокислотной последовательностью RET-киназы и обладает активностью RET-киназы (включительно с рецептором, функция которого в настоящее время остается неизвестной, но будет классифицирована в этом же семействе в будущем). Активность RET-киназы можно определять путем выявления активности фосфорилирования данного рецептора с помощью ТИФА или вестерн-блоттинга.

«Ингибитор RET-киназы» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении RET-киназы. Ингибитор RET-киназы может обладать ингибирующей активностью в отношении других рецепторных тирозинкиназ и других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении RET-киназы.

«KIT-киназа», которая также указана как c-Kit или рецептор SCF, относится к группе рецепторных тирозинкиназ. Кроме того, в данном изобретении «KIT-киназа» также включает соединение, которое имеет гомологию с аминокислотной последовательностью KIT-киназы и обладает активностью KIT-киназы (включительно с рецептором, функция которого в настоящее время остается неизвестной, но будет классифицирована в этом же семействе в будущем).

«Ингибитор KIT-киназы» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении KIT-киназы. Ингибитор KIT-киназы может обладать ингибирующей активностью в отношении других рецепторных тирозинкиназ и других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении KIT-киназы. Активность KIT-киназы можно определять путем выявления активности фосфорилирования данного рецептора с помощью ТИФА или способом вестерн-блоттинга.

«EGF» относится к эпителиальному фактору роста, а «ингибитор EGF» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении передачи сигналов, индуцированных связыванием EGF с его рецептором. Ингибитор EGF может обладать ингибирующей активностью в отношении других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении передачи сигналов, индуцированной EGF.

«Интегрин» представляет собой один из белков клеточной поверхности, главным образом выполняющий роль молекулы клеточной адгезии. По своей структуре он представляет собой гетеродимер, состоящий из α -цепи и β -цепи. К настоящему времени обнаружено 22 типа интегринов, состоящих из различных α -цепей и β -цепей в

комбинации, которые образуют семейство интегринов. «Ингибитор интегрин» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении передачи сигналов, индуцированной связыванием интегрин с его рецептором. Ингибитор интегрин может обладать ингибирующей активностью в отношении других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении передачи сигналов, индуцированной интегрином.

«Матриксная металлопротеаза» относится к группе ион-цинка- (Zn^{2+})-зависимых протеаз, участвующих в деградации внеклеточного матрикса. Известно, что матриксная металлопротеаза разрушает базальную мембрану вокруг кровеносных сосудов, тем самым усиливая ангиогенез. «Ингибитор матриксной металлопротеазы» относится к ингибитору, обладающему ингибирующей активностью в отношении матриксной металлопротеазы. Ингибитор матриксной металлопротеазы может обладать ингибирующей активностью в отношении других биологических молекул при условии, что он обладает ингибирующей активностью в отношении матриксной металлопротеазы.

Слитый белок с SEQ ID NO: 1

В изобретении предложена комбинированная терапия рекомбинантным слитым белком варианта IL-2 человека с SEQ ID NO: 1, описанным в WO 2013/184942, который представляет собой подвергшийся круговой перестановке (кп) вариант IL-2, слитый с внеклеточным доменом участка IL-2R α рецептора IL-2.

Подразумевается, что слитые белки, которые являются близкородственными с SEQ ID NO: 1, такие как слитые белки, имеющие идентичность последовательности около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности на протяжении непрерывной последовательности от по меньшей мере около 20 аминокислот до полной длины SEQ ID NO: 1, также могут подходить для введения в соответствии со способами по изобретению.

Слитый белок с SEQ ID NO: 1 разработан для селективного связывания и активации IL-2R с промежуточной аффинностью, но не высокоаффинного IL-2R. Домен IL-2R α слитого белка с SEQ ID NO: 1 служит для стерического подавления связывания слитого белка с SEQ ID NO: 1 с высокоаффинным IL-2R, в то же время допуская связывание с IL-2R с промежуточной аффинностью.

In vitro и *in vivo* неклинические фармакодинамические (ФД) данные свидетельствуют в пользу селективной сигнализации посредством рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью слитым белком с SEQ ID NO: 1, что приводит к активации и экспансии эффекторных клеток, таких как NK-клетки и CD8⁺ T-клетки, с одновременной минимизацией активации и экспансии иммуносупрессивных T_{reg}. Кроме того, *in vivo* у мышей мышинный суррогат слитого белка SEQ ID NO: 1 демонстрирует улучшенную переносимость по сравнению с рекомбинантным IL-2 человека (rhIL-2) в дозах, которых вызывают эквивалентное или большее размножение эффекторных клеток по сравнению с T_{reg}.

Впервые в человеческих клинических данных, описанных в патентной публикации

США № 20210038684A1, указано, что слитый белок с SEQ ID NO: 1 активирует экспансию CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток дозозависимым образом в отсутствие дозозависимой активации T_{reg}. Следовательно, слитый белок с SEQ ID NO: 1 можно вводить пациентам-людям в концентрации, сравнимой с высокой дозой rhIL-2, чтобы вызвать эквивалентную или большую экспансию NK-клеток и CD8⁺ Т-клеток по сравнению, например, с высокой дозой rhIL-2, но с гораздо меньшей (по меньшей мере в два раза меньшей) относительной экспансией иммуносупрессивных Treg по сравнению с высокой дозой rhIL-2.

Способы схем комбинированной терапии

В данном изобретении представлены способы схем комбинированной терапии для лечения онкологического заболевания у пациента, нуждающегося в этом. Способы по изобретению включают: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза, такого как ингибитор множественных рецепторных тирозинкиназ; при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

В изобретении также предложены схемы комбинированного лечения для лечения рака у пациента, включающие: i) введение пациенту терапевтически эффективного количества варианта слитого белка с SEQ ID NO: 1, причем вариант имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1 на протяжении полной длины SEQ ID NO: 1; и ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза; при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

Предпочтительно эффективное количество SEQ ID NO: 1 или ее варианта представляет собой количество, эффективное для активации промежуточного рецептора IL-2, IL-2R $\beta\gamma$. Предпочтительно эффективное количество ингибитора ангиогенеза представляет собой количество, эффективное для ингибирования роста опухоли. Предпочтительно эффективное количество ингибитора ангиогенеза представляет собой количество, эффективное для ингибирования активности одной или большего числа RTK, включительно с, но не ограничиваясь ими, рецепторами фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3 (VEGFR1-3); рецепторами тромбоцитарного фактора роста типов альфа и бета (PDGFR α/β) и рецепторами фактора роста фибробластов типов 1, 2 и 3 (FGFR1-3).

Что касается этапов введения (i) и (ii), эти этапы введения можно выполнять в любом порядке (а также одновременно), и данное изобретение не ограничено в данном отношении. Этап введения (i) можно выполнять до этапа введения (ii). Этап введения (ii) можно выполнять до этапа введения (i). Оба этапа введения (i) и (ii) можно выполнять одновременно. Этапы введения (i) и/или (ii) можно выполнять повторно. Этапы введения (i) и (ii) можно выполнять только один раз.

Терапевтически эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза не обязательно может быть таким же самым, что

и терапевтически эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 при введении в качестве монотерапии. Однако при условии, что схема комбинированного лечения обеспечивает желаемый результат, количество слитого белка SEQ ID NO: 1, используемое в схеме комбинированного лечения, считается терапевтически эффективным. В общем случае терапевтически эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза представляет собой количество, достаточное для активации целевого промежуточного рецептора IL-2, IL-2R β γ . Активация IL-2R β γ включает, например, экспансию NK-клеток и CD8⁺ T-клеток. Предпочтительно эффективное количество SEQ ID NO: 1 или его варианта представляет собой количество, эффективное, например, для того, чтобы вызвать дозозависимое повышение уровня циркулирующих NK-клеток и CD8⁺ T-клеток у пациента с минимальным, не зависящим от дозы повышением уровня циркулирующих регуляторных T-клеток (Treg). Предпочтительно, повышение уровня циркулирующих NK-клеток и CD8⁺ T-клеток по сравнению с повышением уровня циркулирующих регуляторных T-клеток (Treg) является большим у пациента, которому вводят слитый белок с SEQ ID NO: 1.

Специалист в данной области техники сможет определить это количество, используя стандартные анализы, такие как анализ FACS клеток или тканей, обработанных слитым белком с SEQ ID NO: 1 или комбинированной терапией с ингибитором ангиогенеза, как описано в данном документе. Терапевтически эффективное количество SEQ ID NO: 1 может варьироваться от минимально активирующего до в значительной степени активирующего при условии, что комбинированная терапия с ингибитором ангиогенеза обеспечивает лечение.

В общем случае параметры введения монотерапии слитым белком с SEQ ID NO: 1 или при любой описанной в данном документе комбинированной терапии требуют, чтобы количество дозировки было меньшим, чем количество, которое может быть необратимо токсичным для субъекта (т. е. максимально переносимая доза, «МПД»), и не меньшим, чем количество, необходимое для получения измеримого эффекта у субъекта. Такие количества определяются, например, фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, связанными с профилем ADME, с учетом пути введения и других факторов.

Эффективная доза (ЭД) представляет собой дозу или количество агента, которое вызывает терапевтический ответ или желаемый эффект у некоторой доли субъектов, принимающих его. «Средняя эффективная доза», или ED50, агента представляет собой дозу или количество агента, которое вызывает терапевтический ответ или желаемый эффект у 50% населения, которому его вводят. Хотя ED50, как правило, используется в качестве меры разумного ожидания эффекта от данного агента, она не обязательно представляет собой ту дозу, которую врач может считать подходящей с учетом всех необходимых факторов. Следовательно, в некоторых ситуациях эффективное количество может превышать рассчитанную ED50, в других ситуациях эффективное количество может быть меньшим, чем рассчитанная ED50, и в еще других ситуациях эффективное количество может быть таким же, как рассчитанная ED50.

Кроме того, эффективная доза слитого белка с SEQ ID NO: 1 может представлять собой количество, которое при введении субъекту в одной или более дозах дает желаемый результат по сравнению со здоровым субъектом. Например, для субъекта, испытывающего конкретное нарушение, эффективная доза может быть такой, которая улучшает диагностический параметр, показатель, маркер и т. п. данного нарушения на по меньшей мере около 5%, на по меньшей мере около 10%, на по меньшей мере около 20%, на по меньшей мере около 25%, на по меньшей мере около 30%, на по меньшей мере около 40%, на по меньшей мере около 50%, на по меньшей мере около 60%, на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 90%, где 100% определяется как диагностический параметр, показатель, маркер и т. п., характерный для нормального субъекта.

В данном изобретении предложены дозы, содержащиеся в «единичной лекарственной форме». Выражение «единичная лекарственная форма» относится к физически дискретным единицам, причем каждая единица содержит предопределенное количество слитого белка SEQ ID NO: 1, отдельно или в комбинации с одним или более ингибиторами ангиогенеза (например, ленватинибом) и, необязательно, одним или более дополнительными терапевтическими агентами, достаточное для оказания желаемого эффекта. Следует понимать, что параметры дозированной лекарственной формы будут зависеть от конкретного агента и эффекта, который должен быть достигнут.

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят в виде одной в/в инфузии в день. Одна в/в-инфузия может длиться от 5 минут до 2 часов. Предпочтительно терапевтически эффективное количество SEQ ID NO: 1 представляет собой количество, вводимое пациенту путем в/в инфузии, охватываемое одним или более следующими диапазонами: от около 0,01 до 1 мг/кг; от около 0,01 мг/кг до около 0,1 мг/кг; от около 1 мг/кг до около 1000 мг/кг; от около 2 мг/кг до около 900 мг/кг; от около 3 мг/кг до около 800 мг/кг; от около 4 мг/кг до около 700 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 600 мг/кг; от около 6 мг/кг до около 550 мг/кг; от около 7 мг/кг до около 500 мг/кг; от около 8 мг/кг до около 450 мг/кг; от около 9 мг/кг до около 400 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 200 мг/кг; от около 2 мг/кг до около 150 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 100 мг/кг; от около 10 мг/кг до около 100 мг/кг; и от около 10 мг/кг до около 60 мг/кг, или соответствующую фиксированную дозу на основе массы тела от около 12 кг до около 50 кг или больше для ребенка, или 60-70 кг для взрослого.

Предпочтительно в изобретении предложены фармацевтические композиции для в/в введения, содержащие дозу слитого белка с SEQ ID NO: 1 в терминах мкг/кг, что часто необходимо для пациентов-детей, например, в изобретении предложен слитый белок с SEQ ID NO: 1 в дозе около 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 на основе массы тела от около 12 кг до около 50 кг или больше для ребенка, или 60-70 кг для

взрослого.

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят посредством подкожной инъекции. Предпочтительно в изобретении предложены фармацевтические композиции для подкожного введения, содержащие дозу слитого белка с SEQ ID NO: 1, составляющую по меньшей мере около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,5 мг, 0,8 мг, 0,9 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, или соответствующую фиксированную дозу на основе массы тела от около 12 кг до около 50 кг или больше для ребенка, или 60-70 кг для взрослого. Фармацевтические композиции по изобретению могут необязательно включать фармацевтически приемлемый эксципиент.

Предпочтительно в изобретении предложены фармацевтические композиции для подкожного введения, содержащие дозу слитого белка с SEQ ID NO: 1 в терминах мкг/кг, что часто необходимо для пациентов-детей, например, в изобретении предложен слитый белок с SEQ ID NO: 1 в дозе, составляющей около 0,1 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 0,4 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 0,6 мкг/кг, 0,7 мкг/кг, 0,8 мкг/кг, 0,9 мкг/кг, 1 мкг/кг, 1,5 мкг/кг, 2 мкг/кг, 2,5 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, 15 мкг/кг или соответствующую фиксированную дозу на основе массы тела от около 12 кг до около 50 кг или больше для ребенка, или 60-70 кг для взрослого.

Предпочтительно эффективное количество SEQ ID NO: 1 представляет собой вводимое пациенту количество, охватываемое одним или более следующими диапазонами: от около 0,01 до 1 мг/кг; от около 0,01 мг/кг до около 0,1 мг/кг; от около 1 мг/кг до около 1000 мг/кг; от около 2 мг/кг до около 900 мг/кг; от около 3 мг/кг до около 800 мг/кг; от около 4 мг/кг до около 700 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 600 мг/кг; от около 6 мг/кг до около 550 мг/кг; от около 7 мг/кг до около 500 мг/кг; от около 8 мг/кг до около 450 мг/кг; от около 9 мг/кг до около 400 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 200 мг/кг; от около 2 мг/кг до около 150 мг/кг; от около 5 мг/кг до около 100 мг/кг; от около 10 мг/кг до около 100 мг/кг; и от около 10 мг/кг до около 60 мг/кг.

Предпочтительно схемы введения по изобретению обеспечивают подкожное введение фармацевтической композиции, содержащей слитый белок с SEQ ID NO: 1, около одного раза каждые 3 суток (q3d), около одного раза каждые 4 суток (q4d), около одного раза каждые 5 суток (q5d), около одного раза каждые 6 суток (q6d), около одного раза каждые 7 суток (q7d), около одного раза каждые 8 суток (q8d), около одного раза каждые 9 суток (q9d), около одного раза каждые 10 суток (Q10d), около одного раза каждые 11 суток (q11d), около одного раза каждые 12 суток (q12d), около одного раза каждые 13 суток (q13d), около одного раза каждые 14 суток (q14d), около одного

раза каждые 15 суток (q15d), около одного раза каждые 16 суток (q16d) около одного раза каждые 17 суток (q17), около одного раза каждые 18 суток (q18d), около одного раза каждые 19 суток (q19d), около одного раза каждые 20 суток (q20d), около одного раза каждые 21 сутки, около одного раза каждые 22 суток, около одного раза каждые 23 суток, около одного раза каждые 24 суток, около одного раза каждые 25 суток, около одного раза каждые 26 суток, около одного раза каждые 27 суток или около одного раза каждые 28 суток.

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят подкожно в дозе около 0,1 мг, 1 мг, 3 мг, 6 мг, 10 мг или 30 мг около одного раза каждые 3 суток (q3d), около одного раза каждые 4 суток (q4d), около одного раза каждые 7 суток (q7d), около одного раза каждые 14 суток (q14d) или около одного раза каждые 21 сутки (q21d).

Предпочтительно схема введения доз для введения слитого белка предусматривает один или более курсов лечения. Первый курс лечения может проходить в течение периода времени из нескольких суток, варьирующегося от 1 до 90 суток. Предпочтительно один курс лечения продолжается на протяжении периода времени, который равен 7 суткам, 14 суткам, 21 суткам, 4 неделям, 6 неделям, 8 неделям, 10 неделям, 12 неделям, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 12 месяцам или дольше. Курс лечения может включать, например, подкожное или в/в введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 один или более раз во время курса лечения. Можно проводить один или большее число последовательных курсов лечения, например, первый курс лечения, за которым следует второй курс лечения, предпочтительно - с промежутком времени, например, от одних суток до 1 года между двумя курсами лечения.

Фактическая доза и частота введения слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза будет варьироваться в зависимости от возраста, массы и общего состояния субъекта, а также тяжести патологического состояния, подлежащего лечению, мнения медицинского работника и вводимого конъюгата. Дозы и частоту также можно установить на основе того, реагирует ли пациент на одно или больше число соединений в комбинации. Например, пациенты могут быть чувствительны как к индивидуальным агентам в отдельности, так и к комбинации, но более чувствительны к комбинации. В качестве дополнительного примера, пациенты могут не реагировать на один из индивидуальных агентов, но реагировать на комбинацию. В качестве еще одного примера, пациенты могут не реагировать ни на один из индивидуальных агентов по отдельности, но реагировать на комбинацию.

Способы комбинированной терапии, описанные в данном документе, включают введение по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза в комбинации со слитым белком с SEQ ID NO: 1. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным ингибитором ангиогенеза при условии, что молекула ингибирует ангиогенез. В некоторых случаях благодаря, например, синергетическим эффектам, минимального ингибирования ангиогенеза молекулой может быть достаточно в присутствии слитого белка с SEQ ID NO: 1. В данной области техники известно много ингибиторов ангиогенеза, например, далее

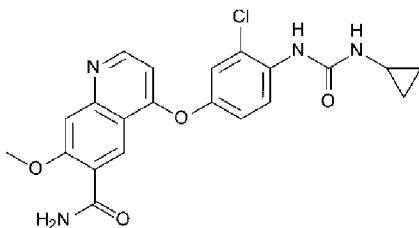
приведен перечень одобренных FDA ингибиторов ангиогенеза:

Акситиниб (Inlyta ®)
 Бевацизумаб (Avastin ®)
 Кабозантиниб (Cometriq ®)
 Эверолимус (Afinitor ®)
 Леналидомид (Revlimid ®)
 Пазопаниб (Votrient ®)
 Рамуцирумаб (Cyramza ®)
 Регорафениб (Stivarga ®)
 Сорафениб (Nexavar ®)
 Сунитиниб (Sutent ®)
 Талидомид (Synovir, Thalomid ®)
 Вандетаниб (Caprelsa ®)
 Зив-афлиберцепт (Zaltrap ®).

Учитывая множество коммерчески доступных ингибиторов ангиогенеза и тех, которые проходят клинические испытания, специалист может обратиться к литературе для получения информации об идентификации и тестировании активности любого потенциального ингибитора ангиогенеза, а также для определения подходящей дозы и частоты, с которой следует вводить ингибитор ангиогенеза отдельно или в комбинации со слитым белком согласно SEQ ID NO: 1. Предпочтительными ингибиторами ангиогенеза являются те, которые способны ингибировать больше чем одну RTK, и они включают в себя ингибиторы множественных рецепторных тирозинкиназ.

Количество вводимого ингибитора ангиогенеза, которое является достаточным для обеспечения ингибирования ангиогенеза, указано в данном документе как «ингибирующее ангиогенез количество» или диапазон доз, ингибирующих ангиогенез. Специалист может обратиться к научной литературе и вкладышу на упаковке коммерчески доступных ингибиторов для определения ингибирующих ангиогенез количеств для применения в комбинированной терапии согласно данному изобретению.

Одним предпочтительным ингибитором рецепторных тирозинкиназ является ленватиниб, 4-[3-хлор-4-(циклопропиламинокарбонил)аминофенокси]-7-метокси-6-хинолинкарбоксамид (CAS № 417716-92-8), или его фармацевтически приемлемая соль (такая как хлористоводородная соль). Ленватиниб более подробно описан в патенте США 7253286, включенном в данный документ посредством ссылки. Ленватиниб представлен формулой I:



Формула I

Предпочтительно ингибирующее ангиогенез количество ленватиниба в качестве суточной пероральной дозы будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Предпочтительно суточная доза для введения путем инъекции, включительно с внутривенными, внутримышечными, подкожными и парентеральными инъекциями, и с помощью способов инфузии будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Предпочтительно суточная доза для введения ректальным путем будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Предпочтительно суточная доза для введения вагинальным путем будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Предпочтительно суточная доза для введения местным путем будет составлять от 0,01 до 200 мг, вводимых от одного до четырех раз в сутки. Предпочтительно трансдермальная концентрация будет такой, которая требуется для поддержания суточной дозы, составляющей от 0,01 до 200 мг/кг. Предпочтительно суточная доза для введения посредством ингаляций будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела.

Предпочтительно, ингибирующее ангиогенез количество ленватиниба составляет от около 1 мг до около 30 мг перорально ежедневно, и более предпочтительно - от около 2 мг до 10 мг перорально ежедневно, и более предпочтительно - от около 5 мг до около 10 мг перорально ежедневно.

Преимущества схем комбинированной терапии.

Комбинированная терапия по изобретению обеспечивает много благоприятных и неожиданных терапевтических эффектов, о чем свидетельствуют данные, полученные для мышей, обработанных SEQ ID NO: 2, мышинным суррогатом SEQ ID NO: 1. Мыши, обработанные комбинациями SEQ ID NO: 2 и ленватиниба и антитела к VEGF, демонстрируют продолжительные полные ответы на комбинированную терапию (**Фиг. 1А** и **Фиг. 2А**) и демонстрируют продленную выживаемость (**Фиг. 1В** и **Фиг. 2В**). SEQ ID NO: 2 может индуцировать повышение уровня CD8⁺ Т-клеток, которое усиливается комбинацией с ленватинибом и антителом к VEGF. Ленватиниб и антитело к VEGF могут индуцировать снижение количества макрофагов, которое усиливается комбинацией с SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 в комбинации с ленватинибом и антителом к VEGF может индуцировать повышение количества дендритных клеток в опухолях и селезенках обработанных мышей. Ленватиниб в комбинации с SEQ ID NO: 2 индуцировал понижение регуляции VEGF-индуцированной экспрессии гена *Esm1* в опухолях, приводящее к опухолевой регрессии у обработанных вышей (**Фиг. 3**). Комбинация ленватиниба с SEQ ID NO: 2 приводила к большей экспрессии цитотоксического гена в опухолях, что приводит к опухолевой регрессии, а также к ингибированию пути VEGF у обработанных мышей (**Фиг. 3**).

Анализ анализ генов, связанных с сигнализацией Т-клеток, позволяет предположить, что комбинация SEQ ID NO: 2 и ленватиниба приводит к большей активации Т-клеток в опухолях обработанных мышей. Повышение экспрессии генов, связанных с антигенной презентацией, коррелирует с повышением инфильтрации дендритными клетками опухолей мышей, обработанных комбинацией SEQ ID NO: 2 и

ленватиниба.

Показания к лечению

Способы комбинированного лечения, описанные в данном документе, особенно подходят для лечения онкологических заболеваний. Раковые клетки могут проникать в близлежащие ткани и распространяться через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Существует несколько основных типов онкологических заболеваний, например, карцинома представляет собой онкологическое заболевание, которое начинается в коже или в тканях, которые выстилают или покрывают внутренние органы. Саркома представляет собой онкологическое заболевание, которое начинается в костях, хрящах, жировой ткани, мышцах, кровеносных сосудах или других соединительных или поддерживающих тканях. Лейкоз представляет собой онкологическое заболевание, которое начинается в кроветворной ткани, такой как костный мозг, и вызывает образование большого числа аномальных клеток крови, которые попадают в кровоток. Лимфома представляет собой онкологическое заболевание, которое начинается в клетках иммунной системы.

Когда нормальные клетки теряют свою способность функционировать как определенная, контролируемая и координируемая единица, тогда образуется опухоль. Как правило, солидная опухоль представляет собой аномальную массу ткани, которая обычно не содержит кисты или жидкие участки (некоторые опухоли головного мозга действительно имеют кисты и центральные некротические участки, заполненные жидкостью). В одной опухоли могут даже находиться разные популяции клеток, с различными процессами, которые не соответствуют норме. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Различные типы солидных опухолей названы на основании типа клеток, которые их образуют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (онкологические заболевания крови), как правило, не образуют солидных опухолей.

Примеры солидных опухолевых раковых образований, которые можно лечить с помощью описанных в данном документе комбинированных схем лечения, включают следующие, но не ограничиваются ими: рак поджелудочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточную карциному; плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак желудка, рак эндометрия, рак головного мозга, рак печени, рак яичника, рак яичка, рак головы, рак шеи, рак кожи (включительно с меланомой и базальной карциномой), рак мезотелиальной выстилки, рак пищевода, рак молочной железы, рак мышцы, рак соединительной ткани, рак легкого (включительно с мелкоклеточной карциномой легкого и немелкоклеточной карциномой), рак надпочечника, рак щитовидной железы, рак почки или рак кости; глиобластома, мезотелиома, рак желудка, саркому, хориокарциному, базальноклеточный рак кожи и тестикулярную семиному. В предпочтительных аспектах онкологическое заболевание представляет собой рак шейки матки, немелкоклеточную карциному легкого, почечно-клеточную карциному;

плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, меланому, лимфому или рак желудка. В более предпочтительных аспектах онкологическое заболевание представляет собой меланому, немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному или рак желудка. Схемы лечения по изобретению особенно подходят для лечения солидных опухолей, включительно со следующими, но не ограничиваясь ими: лимфомы, меланому, почечно-клеточную карциному (ПКК), распространенные солидные опухоли, опухоли, которые ранее лечили терапевтическими способами, но которые остаются невосприимчивыми к предшествующим способам лечения.

Виды рака, которые также можно лечить в соответствии с изобретением, включают, но не ограничиваются этим, острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; острый миелоидный лейкоз взрослых; аденокортикальную карциному; аденокортикальную карциному детей; СПИД-ассоциированную лимфому; СПИД-ассоциированные злокачественные образования; рак анального канала; церебеллярную астроцитому детей; церебральную астроцитому детей; рак внепеченочного желчного протока; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря детей; рак костей, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиобластому детей; глиобластому взрослых; глиому ствола головного мозга детей; опухоль головного мозга взрослых; опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга детей; опухоль головного мозга, церебеллярную астроцитому детей; опухоль головного мозга, церебеллярную астроцитому/злокачественную глиому детей; опухоль головного мозга, эпендимому детей; опухоль головного мозга, медуллобластому детей; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детей; опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса детей; (другую) опухоль головного мозга детей; рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы детей; рак молочной железы у мужчин; бронхиальные аденомы/карциноидные опухоли детей: карциноидную опухоль детей; желудочно-кишечную карциноидную опухоль; аденокортикальную карциному; карциному из островковых клеток; карциному неизвестной первичной локализации; первичную лимфому центральной нервной системы; церебеллярную астроцитому детей; церебеллярную астроцитому/злокачественную глиому детей; рак шейки матки; детскую онкологию; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные расстройства; светлоклеточную саркому сухожильных влагалищ; рак толстой кишки; колоректальный рак детей; кожную Т-клеточную лимфому; рак эндометрия; эпендимому детей; рак эпителия яичников; рак пищевода; рак пищевода детей; семейство опухолей Юинга; экстракраниальную герминогенную опухоль детей; внегонадную герминогенную опухоль; рак внепеченочного желчного протока; рак глаза, интраокулярную меланому; рак глаза, ретинобластому; рак желчного пузыря; рак желудка; рак желудка детей; желудочно-

кишечную карциноидную опухоль; экстракраниальную герминогенную опухоль детей; внегонадную герминогенную опухоль; герминогенную опухоль яичников; гестационную трофобластическую опухоль; глиому ствола головного мозга детей; глиому зрительного пути и гипоталамуса детей; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени) взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени) у детей (первичный); лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детей; лимфому Ходжкина во время беременности; гипофарингеальный рак; глиому гипоталамуса и зрительного пути детей; внутриглазную меланому; рак островковых клеток (эндокринной поджелудочной железы); саркому Капоши; рак почки; рак гортани; рак гортани детей; острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; острый миелоидный лейкоз взрослых; острый миелоидный лейкоз детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; волосатоклеточный лейкоз; рак губ и полости рта; рак печени взрослых (первичный); рак печени детей (первичный); мелкоклеточный рак легкого; мелкоклеточный рак легкого; острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; лимфому, связанную со СПИДом; лимфому центральной нервной системы (первичную); Т-клеточную лимфому кожи; лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детей; лимфому Ходжкина во время беременности; неходжкинскую лимфому взрослых; неходжкинскую лимфому детей; неходжкинскую лимфому во время беременности; первичную лимфому центральной нервной системы; макроглобулинемию Вальденстрема; рак молочной железы мужчин; злокачественную мезотелиому взрослых; злокачественную мезотелиому детей; злокачественную тимому; медуллобластому детей; меланому; внутриглазную меланому; карциному клеток Меркеля; злокачественную мезотелиому; метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной формой; синдром множественной эндокринной неоплазии детей; множественную миелому/плазмаклеточную неоплазию; фунгоидный микоз; миелодиспластические синдромы; хронический миелогенный лейкоз; острый миелоидный лейкоз детей; множественную миелому; хронические миелолиферативные нарушения; рак полости носа и околоносовых пазух; рак носоглотки; рак носоглотки детей; нейробластому; нейрофибромому; неходжкинскую лимфому взрослых; неходжкинскую лимфому детей; неходжкинскую лимфому во время беременности; мелкоклеточный рак легкого; рак полости рта детей; рак полости рта и губ; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичника детей; эпителиальный рак яичника; опухоль герминальных клеток яичника; опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы детей; рак островковых клеток поджелудочной железы; рак околоносовых пазух и полости носа; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитому; примитивные пинеальные и супратенториальные нейроэктодермальные опухоли детей; опухоль гипофиза; неоплазию плазматических клеток/множественную миелому; плевропульмональную бластому; рак молочной железы при беременности;

лимфому Ходжкина при беременности; неходжкинскую лимфому при беременности; первичную лимфому центральной нервной системы; первичный рак печени взрослых; первичный рак печени детей; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (почки); почечно-клеточный рак детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластому; рабдомиосаркому детей; рак слюнных желез; рак слюнных желез детей; саркому из семейства опухолей Юинга; саркому Капоши; саркому (остеосаркому)/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; саркому, рабдомиосаркому детей; саркому мягких тканей взрослых; саркому мягких тканей детей; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи детей; рак кожи (меланому); карциному кожи с клетками Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей взрослых; саркому мягких тканей детей; плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной формой с метастазами; рак желудка; рак желудка (гастрический рак) детей; примитивные супратенториальные нейроэктодермальные опухоли детей; кожную Т-клеточную лимфому; рак яичка; тимому детей; злокачественную тимому; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; гестационную трофобластную опухоль; рак неизвестной первичной локализации у детей; необычные виды онкологических заболеваний детей; переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки; рак уретры; саркому матки; рак влагалища; глиому зрительных путей и гипоталамуса детей; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; и опухоль Вильмса, среди прочих.

Комбинированная терапия по изобретению особенно подходит для лечения солидных опухолей, включая следующие, но не ограничиваясь ими: лимфомы, меланому, почечно-клеточную карциному (ПКК), гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПККГШ), рак яичника, рак молочной железы и трижды негативный рак молочной железы. Комбинированная терапия по изобретению также особенно подходит для лечения прогрессирующих солидных опухолей и опухолей, которые ранее лечили противораковыми терапевтическими способами, но которые остаются невосприимчивыми к предшествующим способам терапии.

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят при комбинированном лечении рака путем парентерального введения, предпочтительно путем подкожной инъекции или внутривенной инъекции, и предпочтительно ленватиниб вводят перорально. При этом предусмотрены другие режимы введения обоих соединений, такие как легочное, назальное, буккальное, ректальное, сублингвальное и трансдермальное. В контексте данного документа термин «парентеральная» включает подкожную, внутривенную, внутриартериальную, внутрибрюшинную, внутрисердечную, интратекальную и внутримышечную инъекцию, а также инфузионные инъекции. Каждый фармакологический компонент способа можно вводить отдельно. В качестве альтернативы, если желательно одновременное введение двух фармакологических компонентов, и если указанные два фармакологических компонента совместимы друг с

другом и в данном фармацевтическом составе, то одновременное введение можно осуществлять путем введения одной лекарственной формы/одного фармацевтического состава (например, внутривенное введение фармацевтического состава для внутривенного введения, который содержит оба фармакологически активных агента). Специалист в данной области техники может определить с помощью рутинного анализа, совместимы ли два заданных фармакологических компонента друг с другом и в данном фармацевтическом составе.

Композиции, вводимые по изобретению, могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант и другую фармацевтическую композицию, содержащую один или большее число терапевтических агентов, таких как терапевтическое антитело, с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адъювантом.

Описанные в данном документе способы комбинированного лечения могут продолжаться до тех пор, пока врач, ведущий данного пациента, считает данный способ лечения эффективным. Неограничивающие параметры, которые указывают на эффективность способа лечения, включают следующее: уменьшение опухоли (с точки зрения веса и/или объема); снижение числа отдельных опухолевых колоний; устранение опухоли; и выживаемость без прогрессирования (ВБП).

Иллюстративные периоды времени, связанные с курсом комбинированной терапии, описанной в данном документе, включают : около одной недели; две недели; около трех недель; около четырех недель; около пяти недель; около шести недель; около семи недель; около восьми недель; около девяти недель; около десяти недель; около одиннадцати недель; около двенадцати недель; около тринадцати недель; около четырнадцати недель; около пятнадцати недель; около шестнадцати недель; около семнадцати недель; около восемнадцати недель; около девятнадцати недель; около двадцати недель; около двадцати одной недели; около двадцати двух недель; около двадцати трех недель; около двадцати четырех недель; около семи месяцев; около восьми месяцев; около девяти месяцев; около десяти месяцев; около одиннадцати месяцев; около двенадцати месяцев; около тринадцати месяцев; около четырнадцати месяцев; около пятнадцати месяцев; около шестнадцати месяцев; около семнадцати месяцев; около восемнадцати месяцев; около девятнадцати месяцев; около двадцати месяцев; около двадцати одного месяца; около двадцати двух месяцев; около двадцати трех месяцев; около двадцати четырех месяцев; около тридцати месяцев; около трех лет; около четырех лет и около пяти лет. Предпочтительно период времени, связанный с комбинированной терапией по изобретению, составляет вплоть до около 2 лет.

Фармацевтические композиции

Слитый белок с SEQ ID NO: 1 и ингибиторы ангиогенеза в соответствии изобретением могут находиться в форме одной или более композиций, подходящих для введения субъекту. В общем случае такие композиции представляют собой

«фармацевтические композиции», содержащие слитый белок с SEQ ID NO: 1 и/или ингибитор(ы) ангиогенеза и один или более фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых разбавителей, носителей или эксципиентов.

Фармацевтические композиции по изобретению можно составлять так, чтобы они были совместимыми с предполагаемым способом или путем введения; иллюстративные способы введения представлены в данном документе. Кроме того, фармацевтические композиции можно применять в комбинации с другими терапевтически активными агентами или соединениями, как описано в данном документе, для лечения или профилактики заболеваний, нарушений и патологических состояний, как предусмотрено данным изобретением.

Фармацевтические композиции, как правило, содержат терапевтически эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 и одного или более фармацевтически или физиологически приемлемых агентов для составления. Подходящие фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые разбавители, носители или эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфат натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метилпарабены, этил или n-пропил, p-гидроксибензоат), эмульгаторы, суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, растворители, наполнители, объемобразующие агенты, детергенты, буферы, несущие среды, разбавители и/или адьюванты. Например, подходящая несущая среда может представлять собой физиологический солевой раствор или солевой раствор с цитратным буфером, возможно, дополненные другими материалами, часто применяемыми в фармацевтической композиции для парентерального введения. Дополнительными иллюстративными несущими средами являются нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. Специалисты в данной области техники легко распознают различные буферы, которые можно использовать в фармацевтических композициях и лекарственных формах, представленных в данном документе. Типичные буферы включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси. В качестве примера, буферными компонентами могут быть водорастворимые материалы, такие 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, Трис-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту (MOPS) и N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS).

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, или в виде дегидрированного или лиофилизированного порошка. Такие фармацевтические

составы можно хранить в готовой к применению форме, лиофилизированной форме, требующей восстановления перед применением, жидкой форме, требующей разбавления перед применением, или в другой приемлемой форме.

Предпочтительно фармацевтическая композиция предоставляется в контейнере одноразового использования (например, флаконе одноразового использования, ампуле, шприце или автоинъекторе (аналогичном, например, EpiPen®)), тогда как контейнер многократного использования (например, флакон многократного использования) предоставляется в других вариантах осуществления. Для доставки фармацевтической композиции можно использовать любое устройство доставки лекарственного препарата, включительно с имплантатами (например, имплантируемыми помпами) и катетерными системами, помпами медленного впрыска и устройствами, все из которых хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Депо-инъекции, которые, как правило, вводят подкожно или внутримышечно, также можно использовать для высвобождения полипептидов, описанных в данном документе, в течение определенного периода времени. Депо-инъекции, как правило, имеют либо твердую, либо масляную основу и, как правило, содержат по меньшей мере один из компонентов фармацевтического состава, описанного в данном документе. Рядовой специалист в данной области техники знаком с возможными фармацевтическими составами и применением депо-инъекций.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильной водной или маслянистой суспензии для инъекции. Такую суспензию можно составить согласно данной области техники с использованием тех подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые указаны в данном документе. Стерильный препарат для инъекций может также находиться в виде стерильного раствора для инъекций или суспензии для инъекций в нетоксичном парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и дисперсионные среды, которые могут быть использованы, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, КРЕМОФОР EL™ (BASF, г. Парсиппани, штат Нью-Джерси, США) или фосфатно-буферный солевой раствор (ФСБ), этанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. В дополнение к этому, стерильные нелетучие масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включительно с синтетическими моно- или диглицеридами. Кроме того, в препарате инъекционных лекарственных форм находят применение жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Пролонгированное всасывание конкретных инъекционных фармацевтических составов можно обеспечить путем включения в них агента, замедляющего всасывание (например, моностеарата алюминия и желатина).

Фармацевтические композиции могут быть в форме, пригодной для перорального применения, например, в виде таблеток, капсул, трoше, пастилок, водных или

маслянистых суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул или сиропов, растворов, микрочастиц или настоев. Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, готовят любым способом, известным в области техники изготовления фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или большее число агентов, таких как, например, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, чтобы обеспечить получение фармацевтически приемлемых и приятных на вкус препаратов. Таблетки, капсулы и т. п. могут содержать активный ингредиент в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми эксципиентами, которые подходят для изготовления таблеток. Указанные эксципиенты представляют собой, например, разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты, например, кукурузный крахмал или альгиновую кислоту; связующие агенты, например, крахмал, желатин или гуммиарабик; и смазывающие агенты, например, стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк.

Таблетки, капсулы и т. п., пригодные для перорального введения, могут быть не покрыты или покрыты оболочкой в соответствии с известными методиками для замедления распада и всасывания в желудочно-кишечном тракте и, следовательно, обеспечения длительного действия. Например, можно использовать пролонгирующий материал, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. Они также могут быть покрыты оболочкой в соответствии с известными в данной области техники методиками для получения осмотических терапевтических таблеток с контролируемым высвобождением. Дополнительные агенты включают биоразлагаемые или биосовместимые частицы, или полимерное вещество, такое как полиэферы, полиаминовые кислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, полиангидриды, полигликолевую кислоту, этиленвинилацетат, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, протаминсульфат или сополимеры лактида/гликолида, сополимеры полилактида/гликолида или сополимеры этиленвинилацетата, чтобы контролировать доставку вводимой композиции. Например, перорально вводимый агент может быть заключен в микрокапсулы, полученные методиками коацервации или межфазной полимеризации, с использованием гидроксиметилцеллюлозных или желатиновых микрокапсул или поли(метилметакрилатных) микрокапсул, соответственно, или в коллоидную систему доставки лекарственного препарата. Коллоидные дисперсионные системы включают комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, включительно с эмульсиями масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Способы получения указанных выше фармацевтических составов будут очевидны специалистам в данной области техники.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция, каолином или микрокристаллической целлюлозой, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых

активный ингредиент смешан с водной или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

Водные суспензии содержат активные соединения в смеси с эксципиентами, пригодными для их изготовления. Такие эксципиенты могут представлять собой суспендирующие агенты, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и гуммиарабик; 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, гептадекаэтиленоксицетанол), или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола (например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитола), или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола (например, моноолеат полиэтиленсорбитола). Водные суспензии могут также содержать один или большее число консервантов.

Маслянистые суспензии можно получать 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. Маслянистые суспензии могут содержать загуститель, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Можно добавлять подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы для получения приятного на вкус препарата для перорального введения.

Диспергируемые порошки и гранулы, пригодные для приготовления водной суспензии путем добавления воды, содержат активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или большим числом консервантов. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов представлены в данном документе.

Фармацевтические композиции также могут быть в форме эмульсий «масло в воде». Маслянистой фазой может быть растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например, жидкий парафин, или их смеси. Подходящими эмульгирующими агентами могут быть природные камеди, например, гуммиарабик или трагакантовая камедь; природные фосфатиды, например, соевые бобы, лецитин, и сложные эфиры или неполные эфиры, полученные из жирных кислот; ангидриды гекситола, например, моноолеат сорбитана; и продукты конденсации неполных эфиров с этиленоксидом, например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

Фармацевтические составы могут также включать носители для защиты композиции от быстрой деградации или выведения из организма, такие как композиции с контролируемым высвобождением, включительно с имплантатами, липосомами, гидрогелями, пролекарствами и микроинкапсулированными системами доставки.

Например, можно использовать пролонгирующий материал, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, или комбинацию с воском.

Суппозитории можно получать путем смешивания лекарственного препарата с подходящим не вызывающим раздражение эксципиентом, который является твердым при стандартных температурах, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, расплавится в прямой кишке, чтобы высвободить лекарственный препарат. Такие материалы включают, но не ограничиваются ими, масло какао и полиэтиленгликоли.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в соответствии с данным изобретением, могут иметь любой формат (например, спрей для назального или ингаляционного применения), известный в настоящее время или разработанный в будущем.

Концентрация слитого белка с SEQ ID NO: 1 или ингибитора(ов) ангиогенеза в фармацевтическом составе может варьироваться в широком диапазоне (например, от менее чем около 0,1%, обычно от или по меньшей мере от около 2% до 20% - 50% или более по массе) и обычно выбрана преимущественно на основании объема жидкости, вязкости и факторов, связанных с субъектом, в соответствии, например, с конкретным выбранным способом введения.

Дополнительные виды дополняющей комбинированной терапии

Другие схемы противоракового лечения в дополнительной комбинации с комбинированной терапией слитым белком с SEQ ID NO: 1 и ингибитором(ами) ангиогенеза также предусмотрены для применения в качестве дополнительной комбинированной терапии для лечения рака. Другие терапевтические схемы лечения включают другие терапевтические виды иммунотерапии, такие как схемы с переносом адоптивных клеток, антигенспецифическая вакцинация, ингибирование белков репарации ДНК (например, ингибиторы нуклеинового фермента поли(аденозин 5'-дифосфорибозо)-полимеразы [«ингибиторы PARP - поли(АДФ-рибозо)-полимеразы») и блокада молекул, ингибирующих иммунную контрольную точку, например, антитела против ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA-4) и антитела против белка программируемой смерти 1 (PD-1).

Схемы лечения слитым белком SEQ ID NO: 1 и ингибитором ангиогенеза в соответствии с изобретением также можно дополнительно комбинировать с другими терапевтическими агентами и/или противораковыми агентами в дополнение к ингибиторам иммунных контрольных точек или вместо них. Предпочтительно терапевтический агент и/или противораковый агент представляют собой антитело. Предпочтительно терапевтический агент представляет собой терапевтический белок. Предпочтительно терапевтический агент представляет собой низкомолекулярное соединение. 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 другой цитотоксический

и/или химиотерапевтический агент. При употреблении в контексте данного документа термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клеток. «Химиотерапевтический агент» включает химические соединения, применимые при лечении онкологического заболевания. Лучевая терапия в качестве другого цитотоксического агента.

Ингибиторы иммунных контрольных точек

Белки иммунных контрольных точек регулируют функцию Т-клеток в иммунной системе. Т-клетки играют центральную роль в клеточном иммунитете. Белки контрольных точек взаимодействуют со специфическими лигандами, которые посылают сигнал в Т-клетку и, по существу, отключают или ингибируют функцию Т-клеток. Раковые клетки используют преимущества данной системы, стимулируя высокие уровни экспрессии белков контрольных точек на своей поверхности, что приводит к контролю Т-клеток, экспрессирующих белки контрольных точек на своей поверхности и попадающих в микроокружение опухоли, что приводит к супрессии противоопухолевого иммунного ответа. По существу, ингибирование белков контрольных точек агентами, указанными в данном документе как «ингибиторы белков иммунных контрольных точек (ингибиторы ICP)», привело бы к восстановлению функции Т-клеток и иммунному ответу на раковые клетки. Примеры белков контрольных точек включают, но не ограничиваются этим: CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, SHK 1, SHK2, A2aR, OX40, лиганды семейства В-7 или их комбинации. Предпочтительно ингибитор иммунной контрольной точки взаимодействует с лигандом белка контрольной точки, который может представлять собой лиганд семейства CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, SHK 1, SHK2, OX40, A2aR, В-7 или их комбинации. Предпочтительно ингибитор контрольной точки представляет собой биологический терапевтический агент или низкомолекулярное соединение. Предпочтительно ингибитор контрольной точки представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, слитый белок или их комбинацию. Предпочтительно ингибитор контрольной точки PD1 включает одно или большее число антител против PD-1, включительно с ниволумабом и пембролизумабом.

Способы комбинированной терапии, описанные в данном документе, включают введение по меньшей мере одного ингибитора контрольных точек в комбинации со слитым белком с SEQ ID NO: 1 и ингибитором ангиогенеза. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным ингибитором контрольных точек при условии, что ингибитор контрольных точек ингибирует один или более видов активности целевых белков контрольных точек при введении в эффективном количестве в качестве монотерапии или в комбинации со слитым белком с SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях благодаря, например, синергетическим эффектам, минимального ингибирования белка контрольных

точек ингибитором контрольных точек может быть достаточно в присутствии слитого белка с SEQ ID NO: 1. В данной области техники известно много ингибиторов контрольных точек, например, далее приведен перечень одобренных FDA ингибиторов белков контрольных точек:

ипилимуаб (YERVOY®)

пембролизумаб (KEYTRUDA®)

атезолизумаб (TECENTRIQ®)

дурвалумаб (IMFINZ®)

авелумаб (BAVENCIO®)

ниволумаб (OPDIVO®).

В предпочтительной схеме лечения по изобретению скомбинированы слитый белок с SEQ ID NO: 1, вводимый в соответствии с изобретением, и ингибитор контрольных точек пембролизумаб. Предпочтительно пембролизумаб вводят в первые сутки каждого курса лечения по схеме лечения по изобретению. Предпочтительно 200 мг пембролизумаба вводят в соответствии с рекомендациями производителя, как правило - один раз в три недели или в 21 сутки.

Антитела

Предпочтительно введение SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза можно дополнительно комбинировать с терапевтическим антителом. Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 7247301, US2008/0138336 и патенте США № 7923221, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Терапевтические антитела, которые можно использовать в способах по изобретению включают, но не ограничиваются ими, любые признанные в данной области техники терапевтические антитела, которые одобрены для применения, которые находятся на стадии клинических испытаний или в разработке для клинического применения. В некоторых вариантах осуществления в комбинированную терапию по изобретению может быть включено больше чем одно терапевтическое антитело.

Неограничивающие примеры терапевтических антител включают следующие, но не ограничиваются ими:

трастузумаб (HERCEPTIN™ от Genentech, г. Южный Сан-Франциско, штат Калифорния, США), который применяется для лечения HER-2/неу-положительного рака молочной железы или метастатического рака молочной железы;

бевацизумаб (AVASTIN™ от Genentech), который применяется для лечения колоректального рака, метастатического колоректального рака, рака молочной железы, метастатического рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого или почечно-клеточной карциномы;

ритуксимаб (RITUXAN™ от Genentech), который применяется для лечения неходжкинской лимфомы или хронического лимфоцитарного лейкоза;

пертузумаб (OMNITARG™ от Genentech), который применяется для лечения рака

молочной железы, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого или рака яичника;

цетуксимаб (ERBITUX™ от ImClone Systems Incorporated, г. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США), который может применяться для лечения колоректального рака, метастатического колоректального рака, рака легкого, рака головы и шеи, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, рака головного мозга, рака поджелудочной железы, рака пищевода, почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, рака шейки матки или рака мочевого пузыря;

ИМС-1С11 (ImClone Systems Incorporated), который применяется для лечения колоректального рака, рака головы и шеи, а также других потенциальных раковых мишеней;

тозитумомаб и тозитумомаб с йодом I^{131} (BEXXAR™ от Corixa Corporation, г. Сиэтл, штат Вашингтон, США), который применяется для лечения неходжкинской лимфомы, которая может быть CD20-положительной, фолликулярной, неходжкинской лимфомой, с трансформацией или без нее, заболевание которой невосприимчиво к ритуксимабу и рецидивировало после химиотерапии;

In^{111} ибиртумомаб тиуксетан; Y^{90} ибиртумомаб тиуксетан; I^{111} ибиртумомаб тиуксетан и Y^{90} ибиртумомаб тиуксетан (ZEVALIN™ от Biogen Idec, г. Кембридж, штат Массачусетс, США), который применяется для лечения лимфомы или неходжкинской лимфомы, которая может включать рецидивирующую фолликулярную лимфому; рецидивирующую или рефрактерную, низкодифференцированную или фолликулярную неходжкинскую лимфому; или трансформированную В-клеточную неходжкинскую лимфому;

EMD 7200 (EMD Pharmaceuticals, г. Дарем, штат Северная Каролина, США), который применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого или рака шейки матки;

SGN-30 (генетически сконструированное моноклональное антитело, нацеленное на антиген CD30, от Seattle Genetics, г. Ботелл, штат Вашингтон, США), которое применяется для лечения лимфомы Ходжкина или неходжкинской лимфомы;

SGN-15 (генетически сконструированное моноклональное антитело, нацеленное на Lewis-γ-родственный антиген, конъюгированное с доксорубицином, от Seattle Genetics), которое применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого;

SGN-33 (гуманизированное антитело, нацеленное на антиген CD33, от Seattle Genetics), которое применяется для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и миелодиспластических синдромов (МДС);

SGN-40 (гуманизированное моноклональное антитело, нацеленное на антиген CD40, от Seattle Genetics), которое применяется для лечения множественной миеломы или неходжкинской лимфомы;

SGN-35 (генетически сконструированное моноклональное антитело, нацеленное на антиген CD30, конъюгированное с ауристатином Е, от Seattle Genetics), которое применяется для лечения неходжкинской лимфомы;

SGN-70 (гуманизированное антитело, нацеленное на антиген CD70, от Seattle Genetics), которое применяется для лечения рака почки и карциномы носоглотки;

SGN-75 (конъюгат, состоящий из антитела SGN70 и производного ауристатиона, от Seattle Genetics); и

SGN-17/19 (слитый белок, содержащий антитело и фермент, конъюгированный с пролекарством мелфалана, от Seattle Genetics), который применяется для лечения меланомы или метастатической меланомы.

Терапевтические антитела для применения в способах данного изобретения не ограничиваются антителами, описанными в данном документе. Например, следующие одобренные терапевтические антитела также можно применять в способах по изобретению: брентуксимаб ведотин (ADCETRIS™) - при анапластической крупноклеточной лимфоме и лимфоме Ходжкина, ипилимумаб (MDX-101; YERVOY™) - при меланоме, офатумумаб (ARZERRA™) - при хроническом лимфоцитарном лейкозе, панитумумаб (VECTIBIX™) - при колоректальном раке, алемтузумаб (CAMPATH™) - при хроническом лимфоцитарном лейкозе, офатумумаб (ARZERRA™) - при хроническом лимфоцитарном лейкозе, гемтузумаб озогамицин (MYLOTARG™) - при остром миелогенном лейкозе.

Антитела для применения в соответствии с данным изобретением могут также нацеливаться на молекулы, экспрессируемые иммунокомпетентными клетками, например, следующие антитела, но не ограничиваясь ими: тремелимумаб (CP-675,206) и ипилимумаб (MDX-010), которые нацелены на CTLA4 и обладают эффектом отторжения опухоли, защиты от повторного возникновения и усиленными опухолеспецифическими ответами Т-клеток; OX86, которое нацелено на OX40 и повышает уровень антигенспецифических CD8+ Т-клеток в опухолевых участках, и усиливает отторжение опухоли; CT-011, которое нацелено на PD1 и обладает эффектом поддержания и увеличения числа опухолеспецифических Т-клеток памяти, и активирует NK-клетки; BMS-663513, которое нацелено на CD137 и вызывает регресс установленных опухолей, а также экспансию и поддержание CD8+ Т-клеток, и даклизумаб (ZENAPAX™), которое нацелено на CD25 и вызывает временное истощение CD4+CD25+FOXP3+ Трег-клеток, усиливает регресс опухоли и увеличивает число эффекторных Т-клеток. Более подробное обсуждение данных антител можно найти, например, в работе Weiner et al., Nature Rev. Immunol 2010; 10:317-27.

Предпочтительно антитело представляет собой антитело, нацеленное на провоспалительные и/или проопухолевые цитокины, включительно со следующими антителами, но не ограничиваясь ими: антитела против фактора некроза опухоли (TNF), антитела, нацеленные на рецептор IL-1Ra, антитела против IL-1, антитела против рецептора IL-6 и антитела против IL-6. Предпочтительно антитела включают те, которые нацелены на провоспалительные Т-хелперные клетки типа 17 (TH17). Терапевтическое антитело может быть фрагментом антитела; комплексом, содержащим антитело; или конъюгатом, содержащим антитело. Антитело необязательно может быть химерным, или

гуманизированным, или полностью человеческим.

Терапевтические белки и полипептиды

Предпочтительно способы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 и ингибитора ангиогенеза в соответствии со схемой лечения по изобретению в дополнительной комбинации с терапевтическим белком или пептидом. Терапевтические белки, которые эффективны при лечении онкологических заболеваний, хорошо известны в данной области техники. Предпочтительно терапевтический полипептид или белок представляет собой «белок суицида», который вызывает гибель клетки сам по себе или в присутствии других соединений.

Репрезентативным примером такого белка суицида является тимидинкиназа вируса простого герпеса. Дополнительные примеры включают тимидинкиназу вируса ветряной оспы, бактериальный ген цитозиндезаминазы (который превращает 5-фторцитозин в высокотоксичное соединение 5-фторурацил), оксидоредуктазу p450, карбоксипептидазу G2, бета-глюкуронидазу, пенициллин-V-амидазу, пенициллин-G-амидазу, бета-лактамазу, нитроредуктазу, карбоксипептидазу A, линамаразу (также называемую β -глюкозидазой), ген *gpt* E. coli и ген *Deo* E. coli, хотя в данной области техники известны и другие. В некоторых вариантах осуществления суицидальный белок превращает пролекарство в токсичное соединение.

При употреблении в контексте данного документа термин «пролекарство» означает любое соединение, используемое в способах по изобретению, которое может быть превращено в токсичный продукт, т. е. токсичный для опухолевых клеток. Пролекарство превращается в токсичный продукт с помощью белка суицида. Репрезентативные примеры таких пролекарств включают: ганцикловир, ацикловир и FIAU (1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-йод-урацил) для тимидинкиназы; ифосфамид для оксидоредуктазы; 6-метоксипуридин-арабинозид для VZV-ТК; 5-фторцитозин для цитозиндезаминазы; доксорубин для бета-глюкуронидазы; СВ 1954 и нитрофуразон для нитроредуктазы; и N-(цианоацетил)-L-фенилаланин или N-(3-хлорпропионил)-L-фенилаланин для карбоксипептидазы A. Пролекарство может быть легко введено рядовым специалистом в данной области техники. Рядовой специалист в данной области техники может легко определить наиболее подходящую дозу и способ введения пролекарства.

Предпочтительно терапевтический белок или полипептид представляет собой супрессор рака, например, p53 или Rb, или нуклеиновую кислоту, кодирующую такой белок или полипептид. Квалифицированные специалисты знают о широком разнообразии таких супрессоров рака и о том, как их получить, и/или о кодирующих их нуклеиновых кислотах.

Другие примеры противораковых/терапевтических белков или полипептидов включают проапоптотические терапевтические белки и полипептиды, например, p15, p16 или p21^{WAF-1}.

Цитокины и кодирующие их нуклеиновые кислоты также можно использовать в качестве терапевтических белков и полипептидов. Примеры включают: GM-CSF

(гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор); TNF-альфа (фактор некроза опухоли альфа); интерфероны, включая, но не ограничиваясь ими, IFN-альфа и IFN-гамма; и интерлейкины, включая, но не ограничиваясь ими, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-бета (IL-бета), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-5 (IL-5), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-13 (IL-13), интерлейкин-14 (IL-14), интерлейкин-15 (IL-15), интерлейкин-16 (IL-16), интерлейкин-18 (IL-18), интерлейкин-23 (IL-23), интерлейкин-24 (IL-24), хотя в данной области техники известны и другие варианты осуществления.

Дополнительные примеры цитоцидных генов включают , но не ограничиваются ими, мутированные гены циклина G1. В качестве примера, цитоцидный ген может представлять собой доминантную отрицательную мутацию белка циклин G1 (например, WO/01/64870).

Вакцины

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с введением противораковой вакцины для стимуляции специфического к раку иммунного ответа, например, врожденного и адаптивного иммунных ответов, для генерации иммунитета хозяина против рака. Иллюстративные вакцины включают , но не ограничиваются ими, например, антигенные вакцины, цельноклеточные вакцины, вакцины из дендритных клеток и ДНК-вакцины. В зависимости от конкретного типа вакцины, вакцинная композиция может включать один или большее число подходящих адъювантов, которые, как известно, усиливают иммунный ответ субъекта на данную вакцину.

Вакцина может быть, например, на клеточной основе, т. е. создана с использованием клеток из собственных раковых клеток пациента для идентификации и получения антигена. Иллюстративные вакцины включают вакцины на основе опухолевых клеток и вакцины на основе дендритных клеток, при этом активированные иммунокомпетентные клетки субъекта доставляют обратно тому же субъекту вместе с другими белками, чтобы дополнительно способствовать иммунной активации иммунокомпетентных клеток, праймированных опухолевым антигеном. Вакцины на основе опухолевых клеток включают цельные опухолевые клетки и генно-модифицированные опухолевые клетки. Вакцины из цельных опухолевых клеток необязательно могут быть обработаны для усиления презентации антигена, например, путем облучения либо опухолевых клеток, либо опухолевых лизатов. Введение вакцины может также сопровождаться введением адъювантов, таких как bacillus calmette-guerin (BCG) или гемоцианин моллюска *Megathura crenulata* (KLH), в зависимости от типа используемой вакцины. Также можно использовать вакцины с плазмидной ДНК, которые можно вводить путем прямой инъекции или биологическим путем. Также предусмотрено использование пептидных вакцин, векторных вакцин для переноса вирусных генов и

модифицированных антигеном дендритных клеток (ДК).

Предпочтительно вакцина представляет собой терапевтическую противораковую вакцину на пептидной основе. Пептидные вакцины можно получать с использованием известных последовательностей или из выделенных антигенов собственной опухоли (опухолей) субъекта, и они включают неоантигены и модифицированные антигены. Иллюстративные вакцины на основе антигена включают вакцины, в которых антиген представляет собой опухолеспецифический антиген. Например, опухолеспецифический антиген может быть выбран из антигена рака яичка, антигена дифференцировки и широко распространенного сверхэкспрессируемого антигена, ассоциированного с опухолью, среди прочих. Рекомбинантные пептидные вакцины, основанные на пептидах из ассоциированных с опухолью антигенов, при использовании в указанном способе можно вводить или составлять с адьювантом или иммуномодулятором. Иллюстративные антигены для использования в вакцине на пептидной основе включают следующие, но не ограничиваются ими, поскольку указанный перечень предназначен исключительно в иллюстративных целях. Например, пептидная вакцина может содержать антиген рака яичка, такой как MAGE, BAGE, NY-ESO-1 и SSX-2, кодируемый генами, которые в норме не экспрессируются во взрослых тканях, но транскрипционно реактивируются в опухолевых клетках. В качестве альтернативы, пептидная вакцина может содержать антиген, ассоциированный с дифференцировкой тканей, т. е. антиген нормального тканевого происхождения, общий как для нормальной, так и для опухолевой ткани. Например, вакцина может содержать ассоциированный с меланомой антиген, такой как gp100, Melan-A/Mart-1, MAGE-3, или тирозиназу; или может содержать антиген рака предстательной железы, такой как PSA или PAP. Вакцина может содержать антиген, ассоциированный с раком молочной железы, такой как маммаглобин-А. Другие опухолевые антигены, которые могут содержаться в вакцине для применения в представленном способе, включают, например, CEA, MUC-1, HER1/Neu, hTERT, gas и B-gal. Другие подходящие антигены, которые можно использовать в вакцине, включают SOX-2 и OCT-4, связанные с раковыми стволовыми клетками или процессом EMT.

Антигенные вакцины включают мультиантигенные и одноантигенные вакцины. Иллюстративные раковые антигены могут включать пептиды, содержащие от около 5 до около 30 аминокислот или от около 6 до 25 аминокислот, или от около 8 до 20 аминокислот.

Как описано выше, в вакцине, в частности, в вакцине на основе ассоциированного с опухолью антигена, можно использовать иммуностимуляторный адьювант (отличный от RSLAIL-2) для содействия генерированию эффективного иммунного ответа. Например, вакцина может содержать молекулярный паттерн, ассоциированный с патогеном (PAMP), для содействия улучшению иммунных функций. Дополнительные подходящие адьюванты включают монофосфориллипид А или другие липополисахариды; агонисты toll-подобных рецепторов (TLR), такие как, например, имиквимод, ресиквимод (R-848), TLR3, IMO-8400 и ринтатолимод. Дополнительные адьюванты, пригодные для применения, включают

белки теплового шока.

В генетической вакцине, как правило, используются вирусные или плазмидные ДНК-векторы, несущие кассеты экспрессии. При введении они трансфицируют соматические клетки или дендритные клетки как часть воспалительной реакции, чтобы тем самым привести к перекрестному праймированию или прямой презентации антигена. Предпочтительно генетическая вакцина представляет собой вакцину, которая обеспечивает доставку множества антигенов в ходе одной иммунизации. Генетические вакцины включают ДНК-вакцины, РНК-вакцины и вакцины на основе вирусов. ДНК-вакцины для применения в указанных способах представляют собой бактериальные плазмиды, сконструированные для доставки и экспрессии опухолевого антигена. ДНК-вакцины можно вводить любым подходящим способом введения, например, подкожной или внутривенной инъекцией, но также можно вводить непосредственно в лимфатические узлы. Дополнительные способы доставки включают, например, генную пушку, электропорацию, ультразвук, лазер, липосомы, микрочастицы и наночастицы.

Предпочтительно вакцина содержит неоантиген или множество неоантигенов. Предпочтительно вакцина представляет собой вакцину на основе неоантигена. Предпочтительно композиция вакцины на основе неоантигена (NBV) может кодировать множественные раковые неоантигены в тандеме, где каждый неоантиген представляет собой полипептидный фрагмент, полученный из белка, мутировавшего в раковых клетках. Например, неоантигенная вакцина может содержать первый вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую множество иммуногенных полипептидных фрагментов, каждый из которых представляет собой белок, мутированный в раковых клетках, при этом каждый иммуногенный полипептидный фрагмент содержит одну или большее число мутированных аминокислот, фланкированных переменным числом аминокислот дикого типа из исходного белка, и каждый полипептидный фрагмент соединяется «голова к хвосту» с образованием иммуногенного полипептида. Длины каждого из иммуногенных полипептидных фрагментов, образующих иммуногенный полипептид, могут варьироваться.

Также можно использовать векторные вакцины с переносом вирусных генов; в таких вакцинах рекомбинантные сконструированные вирус, дрожжи, бактерии или т. п. используют для введения специфичных для рака белков в иммунокомпетентные клетки пациента. При подходе на основе вектора, который может быть опухолелитическим или не быть таковым, вектор может повышать эффективность вакцины благодаря, например, присущим ему иммуностимуляторным свойствам. Иллюстративные векторы на основе вирусов включают векторы из семейства *Poxviridae*, такие как вирус коровьей оспы, модифицированный штамм вируса коровьей оспы Ankara и авипоксвирусы. Также пригодна для использования противораковая вакцина PROSTVAC, содержащая репликационно-компетентный праймирующий вектор вируса коровьей оспы и репликационно-некомпетентный бустерный вектор вируса оспы птиц. Каждый вектор содержит трансгены для PSA и три костимуляторные молекулы - CD80, CD54 и CD58,

которые в совокупности называются TRICOM. Другие подходящие противораковые вакцины на основе векторов включают Trovac и TG4010 (кодирующие антиген MUC1 и IL-2). Дополнительные вакцины для применения включают вакцины на основе бактерий и дрожжей, таких как рекомбинантные *Listeria monocytogenes* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Указанные выше вакцины можно комбинировать и/или составлять с адъювантами и другими иммуностимуляторами для повышения эффективности. В зависимости от конкретной вакцины введение может быть как внутриопухолевым, так и не внутриопухолевым (т. е. системным).

Малые молекулы

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с введением противораковой малой молекулы. Малые молекулы, которые эффективны при лечении онкологических заболеваний, хорошо известны в данной области техники и включают антагонисты факторов, участвующих в росте опухоли, таких как EGFR, ErbB2 (также известный как Her2), ErbB3, ErbB4 или TNF. Неограничивающие примеры включают малые молекулы - ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (RTKI), которые нацелены на один или большее число рецепторов тирозинкиназы, таких как рецепторы VEGF, рецепторы FGF, рецепторы EGF и рецепторы PDGF.

В данной области известно множество терапевтических малых молекул - RTKI, включая следующие, но не ограничиваясь ими: ваталаниб (PTK787), эрлотиниб (TARCEVA™), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA™), ZD6126 (ANG453), ZD1839, сунитиниб (SUTENT™), семаксаниб (SU5416), AMG706, AG013736, иматиниб (GLEEVEC™), MLN-518, CEP-701, PKC-412, лапатиниб (GSK572016), VELCADE™, AZD2171, сорафениб (NEXAVAR™), XL880 и CHIR-265. Малые молекулы - ингибиторы протеин-тирозинфосфатазы, такие как те, которые описаны в работе Jiang et al., *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27:263-72, также полезны для осуществления способов по изобретению. Такие ингибиторы могут быть нацелены, например, на фосфатазы HSP2, PRL, PTP1B или Cdc25.

Малые молекулы, которые нацелены на Bcl-2/Bcl-XL, такие как те, которые раскрыты в US2008/0058322, также полезны для осуществления способов по изобретению. Дополнительные примеры малых молекул для применения в настоящем изобретении описаны в Zhang et al. *Nature Reviews: Cancer* 2009; 9:28-39. В частности, химиотерапевтические агенты, которые приводят к иммуногенной гибели клеток, такие как антрациклины (Kepp et al., *Cancer and Metastasis Reviews* 2011;30: 61-9) хорошо подходят для синергических эффектов с IL-2 пролонгированной фармакокинетики.

Раковые антигены

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с раковым антигеном, например, для применения в качестве противораковой вакцины (смотрите, например, Overwijk, et al., *Journal of Experimental Medicine* 2008; 198:569-80). Другие раковые антигены, которые можно использовать в вакцинации,

включают следующие, но не ограничиваются ими: (i) опухолеспецифические антигены; (ii) ассоциированные с опухолью антигены; (iii) клетки, которые экспрессируют опухолеспецифические антигены; (iv) клетки, которые экспрессируют ассоциированные с опухолью антигены; (v) эмбриональные антигены на опухолях; (vi) аутологичные опухолевые клетки; (vii) опухолеспецифические мембранные антигены; (viii) ассоциированные с опухолью мембранные антигены; (ix) рецепторы факторов роста; (x) лиганды факторов роста; и (xi) любой другой тип антигена, антигенпрезентирующей клетки или материала, ассоциированного с онкологическим заболеванием.

Раковый антиген может представлять собой антиген эпителиального рака (например, молочной железы, желудочно-кишечного тракта, легкого), простатоспецифический раковый антиген (PSA) или простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), антиген рака мочевого пузыря, антиген рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого), антиген рака толстой кишки, антиген рака яичника, антиген рака головного мозга, антиген рака желудка, антиген почечно-клеточной карциномы, антиген рака поджелудочной железы, антиген рака печени, антиген рака пищевода, антиген рака головы и шеи или антиген колоректального рака.

В другом варианте осуществления данного изобретения раковый антиген представляет собой антиген лимфомы (например, неходжкинской лимфомы или лимфомы Ходжкина), раковый антиген В-клеточной лимфомы, антиген лейкоза, антиген миеломы (например, множественной миеломы или плазмоклеточной миеломы), антиген острого лимфобластного лейкоза, антиген хронического миелоидного лейкоза или антиген острого миелолейкоза. Описанные раковые антигены являются только иллюстративными, и нацеливание по изобретению может быть на любой раковый антиген.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой белок или пептид муцин-1 (MUC-1), который обнаруживается во всех аденокарциномах человека: в аденокарциноме поджелудочной железы, толстой кишки, молочной железы, яичника, легкого, предстательной железы, головы и шеи, включительно с множественными миеломами и некоторыми В-клеточными лимфомами. Пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника, будь то болезнь Крона или язвенный колит, подвергаются повышенному риску развития колоректальной карциномы. MUC-1 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I. Основная внеклеточная часть MUC-1 имеет большое число tandemных повторов, состоящих из 20 аминокислот, которые содержат иммуногенные эпитопы. При некоторых видах онкологических заболеваний он экспонируется в негликозилированной форме, которая распознается иммунной системой (Gendler et al., J Biol Chem 1990; 265:15286-15293).

В другом варианте осуществления данного изобретения раковый антиген представляет собой мутированный антиген B-Raf, который ассоциирован с меланомой и раком толстой кишки. Подавляющее большинство таких мутаций представляют собой однонуклеотидное изменение Т-А в нуклеotide 1796, приводящее к замещению валина глутаминовой кислотой в остатке 599 в активационном сегменте B-Raf. Белки Raf также

косвенно связаны с онкологическими заболеваниями в качестве эффекторов активированных белков Ras, онкогенные формы которых присутствуют в около одной трети всех случаев онкологических заболеваний человека. Нормальный, немутированный B-Raf участвует в клеточной передаче сигналов, передавая сигналы от клеточной мембраны к ядру. Данный белок, как правило, активен только тогда, когда это необходимо для передачи сигналов. В противоположность этому, сообщалось, что мутантный B-Raf постоянно активен, нарушая передачу сигналов (Mercer and Pritchard, *Biochim Biophys Acta* (2003) 1653(1):25-40; Sharkey et al., *Cancer Res.* (2004) 64(5):1595-1599).

Предпочтительно раковый антиген представляет собой антиген рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (HER-2/neu). Онкологические заболевания, в которых есть клетки, которые сверхэкспрессируют HER-2/neu, называют раком HER-2/neu⁺. Примеры рака HER-2/neu⁺ включают рак предстательной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак печени (например, гепатоцеллюлярная аденокарцинома), рак кишечника и рак мочевого пузыря.

HER-2/neu имеет внеклеточный связывающий домен (ECD), состоящий из около 645 аминокислотных остатков (а. о.), с 40% гомологией рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), высокогидрофобный трансмембранный якорный домен (TMD) и карбоксиконцевой внутриклеточный домен (ICD), состоящий из около 580 а. о., с 80% гомологией EGFR. Нуклеотидная последовательность HER-2/neu доступна в GENBANK™ под №№ доступа AN002823 (ген HER-2 человека, промоторная область и экзон 1); M16792 (ген HER-2 человека, экзон 4); M16791 (ген HER-2 человека, экзон 3); M16790 (ген HER-2 человека, экзон 2); и M16789 (ген HER-2 человека, промоторная область и экзон 1). Аминокислотная последовательность белка HER-2/neu доступна в GENBANK™. Учетный номер: AAA58637. Основываясь на данных последовательностях, специалист в данной области техники может разработать антигены HER-2/neu с использованием известных анализов для поиска подходящих эпитопов, которые генерируют эффективный иммунный ответ.

Примеры антигенов HER-2/neu включают р369-377 (пептид HLA-A2, полученный из HER-2/neu); dHER2 (Corixa Corporation); гибрид эпитопа li-Key ГКГ класса II (Generech Biotechnology Corporation); пептид P4 (аминокислоты 378-398); пептид P7 (аминокислоты 610-623); смесь пептидов P6 (аминокислоты 544-560) и P7; смесь пептидов P4, P6 и P7; HER2 [9₇₅₄]; и т. п.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой антиген рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Антиген EGFR может представлять собой вариант 1 антигена EGFR, вариант 2 антигена EGFR, вариант 3 антигена EGFR и/или вариант 4 антигена EGFR. Онкологические заболевания с клетками, которые сверхэкспрессируют EGFR, называют EGFR-раком. Примеры EGFR-рака включают рак легкого, рак головы и шеи, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак желудка, рак яичника, рак головного мозга и рак мочевого пузыря.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой антиген рецептора фактора

роста эндотелия сосудов (VEGFR). VEGFR считается регулятором индуцированного раком ангиогенеза. Онкологические заболевания с клетками, которые сверхэкспрессируют VEGFR, называют раком VEGFR⁺. Примеры рака VEGFR⁺ включают рак молочной железы, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак почки, лейкоз и лимфоцитарный лейкоз.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой простатоспецифический антиген (PSA) и/или простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), которые преимущественно экспрессируются при андроген-независимом раке предстательной железы.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой Grp-100. Гликопротеин 100 (gp 100) является опухолеспецифическим антигеном, ассоциированным с меланомой.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой карциноэмбриональный (CEA) антиген. Онкологические заболевания с клетками, которые сверхэкспрессируют CEA, называют раком CEA⁺. Примеры рака CEA⁺ включают колоректальный рак, рак желудка и рак поджелудочной железы. Примеры антигенов CEA включают CAP-1 (т. е. CEA, аминокислоты 571-579), CAP1-6D, CAP-2 (т. е. CEA, аминокислоты 555-579), CAP-3 (т. е. CEA, аминокислоты 87-89), CAP-4 (CEA, аминокислоты 1-11), CAP-5 (т. е. CEA, аминокислоты 345-354), CAP-6 (т. е. CEA, аминокислоты 19-28) и CAP-7.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой углеводный антиген 10.9 (CA 19.9). CA 19.9 представляет собой олигосахарид, родственный веществу группы крови Lewis A, и ассоциируется с колоректальным раком.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой раковый антиген меланомы. Антигены рака меланомы применимы при лечении меланомы. Примеры раковых антигенов меланомы включают MART-1 (например, пептид MART-1, аминокислоты 26-35; пептид MART-1, аминокислоты 27-35); MART-1/Melan A; pMel17; pMel17/gp100; gp100 (например, пептид gp 100, аминокислоты 280-288; пептид gp 100, аминокислоты 154-162; пептид gp 100, аминокислоты 457-467); TRP-1; TRP-2; NY-ESO-1; p16; бета-катенин; tum-1; и т. п.

Предпочтительно раковый антиген представляет собой пептид gas мутантного или дикого типа. Мутантный пептид gas может представлять собой мутантный пептид K-gas, мутантный пептид N-gas и/или мутантный пептид H-gas. Мутации в белке gas, как правило, происходят в положениях 12 (например, замещение аргинина или валина глицином), 13 (например, замещение аспарагина глицином), 61 (например, замещение глутамина лейцином) и/или 59. Мутантные пептиды gas могут быть применимы в качестве антигенов рака легкого, антигенов рака желудочно-кишечного тракта, антигенов гепатомы, антигенов миелоидного рака (например, острого лейкоза, миелодисплазии), антигенов рака кожи (например, меланомы, базально-клеточного, плоскоклеточного рака), антигенов рака мочевого пузыря, антигенов рака толстой кишки, антигенов колоректального рака и антигенов почечно-клеточного рака.

В другом варианте осуществления данного изобретения раковый антиген

представляет собой мутантный пептид p53 и/или пептид p53 дикого типа. Пептид p53 может быть применим в качестве антигенов рака толстой кишки, антигенов рака легкого, антигенов рака молочной железы, раковых антигенов гепатоцеллюлярной карциномы, раковых антигенов лимфомы, антигенов рака предстательной железы, антигенов рака щитовидной железы, антигенов рака мочевого пузыря, антигенов рака поджелудочной железы и антигенов рака яичника.

Раковый антиген может представлять собой клетку, белок, пептид, слитый белок, ДНК, кодирующую пептид или белок, РНК, кодирующую пептид или белок, гликопротеин, липопротеин, фосфопротеин, углевод, липополисахарид, липид, химически связанную комбинацию двух или большего числа из них, слитую молекулу двух или большего числа из них, или смесь двух или большего числа из них, или вирус, кодирующий два или большее число из них, или онколитический вирус, кодирующий два или большее число из них. В другом варианте осуществления раковый антиген представляет собой пептид, содержащий от около 6 до около 24 аминокислот; от около 8 до около 20 аминокислот; от около 8 до около 12 аминокислот; от около 8 до около 10 аминокислот; или от около 12 до около 20 аминокислот. В одном варианте осуществления раковый антиген представляет собой пептид, имеющий мотив связывания ГКГС класса I или мотив связывания ГКГС класса II. В другом варианте осуществления раковый антиген включает пептид, который соответствует одному или большему числу эпитопов цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

Клеточная терапия

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с терапевтической клеточной терапией. Варианты клеточной терапии, которые применимы для лечения рака, хорошо известны и описаны, например, в патенте США № 7402431. В предпочтительном варианте осуществления клеточная терапия представляет собой пересадку Т-клеток. В предпочтительном варианте осуществления Т-клетки размножают *ex vivo* с ИЛ-2 перед трансплантацией пациенту. Способы клеточной терапии описаны, например, в патенте США № 7402431, US2006/0057121, патенте США № 5126132, патенте США № 6255073, патенте США № 5846827, патенте США № 6251385, патенте США № 6194207, патенте США № 5443983, патенте США № 6040177, патенте США № 5766920 и US2008/0279836.

Другие цитотоксические и химиотерапевтические агенты

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами, включая, но не ограничиваясь этим, алкилирующие агенты, противоопухолевые антибиотики, антиметаболиты, другие противоопухолевые антибиотики и растительные агенты.

Алкилирующие агенты представляют собой лекарственные препараты, которые нарушают клеточную функцию, образуя ковалентные связи с амино-, карбоксильными,

сульфгидрильными и/или фосфатными группами в биологически важных молекулах. Наиболее важными участками алкилирования являются ДНК, РНК и белки. Активность алкилирующих агентов зависит от клеточной пролиферации, но не зависит от фазы клеточного цикла. Алкилирующие агенты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, бихлорэтиламинами (азотные иприты, например, хлорамбуцил, циклофосфамид, ифосфамид, мехлорэтамин, мелфалан, урацил-горчица), азиридины (например, тиотепа), алкилалкон-сульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевины (например, BCNU, кармустин, ломустин, стрептозоцин), неклассические алкилирующие агенты (например, альтретамин, дакарбазин и прокарбазин) и соединения платины (например, карбоплатин, оксалиплатин и цисплатин).

Противоопухолевые антибиотики, такие как адриаамицин, интеркалируют ДНК в последовательностях гуанин-цитозин и гуанин-тимин, что приводит к спонтанному окислению и образованию свободных кислородных радикалов, которые вызывают разрыв нитей. Другие антибиотические агенты, подходящие для применения в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, антрациклины (например, доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин и антрацендион), митомицин С, блеомицин, дактиномицин и пликатомицин.

Антиметаболические агенты, подходящие для применения в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, флоксуридин, фторурацил, метотрексат, лейковорин, гидроксимочевину, тиогуанин, меркаптопурин, цитарабин, пентостатин, флударабин фосфат, кладрибин, аспарагиназу и гемцитабин.

Агенты растительного происхождения включают таксаны, которые представляют собой полусинтетические производные прекурсоров, экстрагированных из хвои тисовых растений. Эти лекарственные препараты содержат новое 14-членное кольцо - таксан. В отличие от алкалоидов *барвинка*, которые вызывают разборку микротрубочек, таксаны (например, таксол) способствуют сборке и стабильности микротрубочек, тем самым блокируя клеточный цикл в митозе. Другие агенты растительного происхождения включают, но не ограничиваются ими, винкристин, винбластин, виндезин, винзолидин, винорелбин, этопозид, тенипозид и доцетаксел.

Лучевая терапия

Предпочтительно терапевтические схемы по изобретению включают введение слитого белка с SEQ ID NO: 1 в комбинации с ингибитором ангиогенеза в дополнительной комбинации с лучевой терапией. Термин «лучевая терапия» может употребляться взаимозаменяемо с термином «радиационная терапия» и представляет собой тип лечения онкологических заболеваний, в котором применяются лучи интенсивной энергии для уничтожения раковых клеток. В лучевой терапии чаще всего применяют рентгеновские лучи, но также можно применять гамма-лучи, пучки электронов или протоны. Термин «лучевая терапия» чаще всего относится к внешней лучевой терапии. Во время этого типа облучения высокоэнергетические лучи исходят от устройства вне тела пациента, которое

направляет лучи в конкретную точку на теле пациента. Каждый сеанс проходит быстро и безболезненно, и длится около 15 минут. При употреблении в контексте данного документа термин «сеанс» или «сеанс лечения» относится к каждому лучевому лечению. «Схема» или «график» лучевой терапии, как правило, состоит из определенного числа процедур, проводимых в течение определенного периода времени, в зависимости от типа и стадии онкологического заболевания.

Рекомбинантное производство

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 получают, используя рекомбинантные технологии. Слитый белок можно получать как внутриклеточный белок или как секретируемый белок, используя любую подходящую конструкцию и любую подходящую клетку-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 клетки растений. В случаях использования клеток-хозяев млекопитающих, они могут включать клетки человека (например, клетки HeLa, 293, H9 и Jurkat); клетки мыши (например, NIH3T3, L-клетки и клетки C127); клетки приматов (например, Cos 1, Cos 7 и CV1); и клетки хомяка (например, клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO)).

Ряд систем хозяин-вектор, подходящих для экспрессии полипептида, можно использовать в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Смотрите, 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 тому подобное. Способ переноса можно выбирать так, чтобы обеспечить стабильную экспрессию введенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, может быть предоставлена в виде наследуемого эпизомного элемента (например, плазмиды) или может быть геномно интегрирована. Множество подходящих векторов для использования в производстве полипептида, представляющего интерес, коммерчески доступны.

Векторы могут обеспечивать внехромосомное поддержание в клетке-хозяине или могут обеспечивать интеграцию в геном клетки-хозяина. Вектор экспрессии обеспечивает транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности, и может обеспечивать индуцируемую или конститутивную экспрессию, при этом кодирующая область функционально связана с областью инициации транскрипции для транскрипционного контроля и с областью терминации транскрипции и трансляции. В общем, транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности могут включать, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, сайты связывания рибосом, транскрипционные старт- и стоп-последовательности, трансляционные старт- и стоп-последовательности, и энхансерные или активаторные

последовательности. Промоторы могут быть либо конститутивными, либо индуцируемыми, и могут представлять собой сильный конститутивный промотор (например, T7).

Конструкции экспрессии, как правило, имеют удобные сайты рестрикции, расположенные возле промоторной последовательности, чтобы обеспечивать вставку последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих представляющие интерес белки. Селектируемый маркер, действующий в экспрессирующем хозяине, может присутствовать для облегчения отбора клеток, содержащих данный вектор. Более того, конструкция экспрессии может включать дополнительные элементы. Например, вектор экспрессии может иметь одну или две системы репликации, так что его можно поддерживать в двух разных организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации. В дополнение к этому, конструкция экспрессии может содержать ген селективного маркера, позволяющий осуществлять отбор трансформированных клеток-хозяев. Селективные гены хорошо известны в данной области техники и варьируются в зависимости от используемой клетки-хозяина.

Выделение и очистку белка можно проводить в соответствии со способами, известными в данной области техники. Например, белок можно выделять из лизата клеток, генетически модифицированных для конститутивной и/или пост-индукционной экспрессии этого белка, или из синтетической реакционной смеси путем иммуноаффинной очистки, которая, как правило, включает приведение образца в контакт с антителом к белку, промывку для удаления неспецифически связанного материала и элюирование специфически связанного белка. Выделенный белок можно дополнительно очищать с помощью диализа и других способов, обычно используемых для очистки белка. В одном варианте осуществления белок можно выделять с использованием способов металло-хелатной хроматографии. Белки могут содержать модификации, облегчающие выделение.

Слитый белок с SEQ ID NO: 1 можно получать в по существу чистой или выделенной форме (например, без других полипептидов). Полипептиды могут присутствовать в композиции, которая обогащена данным полипептидом по сравнению с другими компонентами, которые могут присутствовать в ней (например, другими полипептидами или другими компонентами клетки-хозяина). Например, очищенный слитый белок может быть предоставлен таким образом, чтобы слитый белок присутствовал в композиции, которая по существу не содержит других экспрессируемых белков, например, меньше чем около 90%, меньше чем около 60%, меньше чем около 50%, меньше чем около 40%, меньше чем около 30%, меньше чем около 20%, меньше чем около 10%, меньше чем около 5% или меньше чем около 1%.

Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 можно получать, используя биологическую рекомбинантную экспрессионную систему, как правило, включающую трансфекцию клеток ДНК-вектором, который содержит генетическую матрицу,

кодирующую слитый белок с SEQ ID NO: 1, и затем культивирование клеток так, чтобы они транскрибировали и транслировали слитый белок. Как правило, затем клетки подвергают лизису для извлечения экспрессируемого белка для последующей очистки. Для использования подходят как прокариотические, так и эукариотические системы экспрессии белка *in vivo*. Предпочтительно слитый белок с SEQ ID NO: 1 получают в клетках СНО.

Наборы

Также предложены наборы, содержащие слитый белок с SEQ ID NO: 1, составленный для введения, и, необязательно, любой другой химиотерапевтический или противораковый агент. Как правило, наборы имеют форму физической структуры, содержащей различные компоненты, как описано ниже, и могут использоваться, например, при осуществлении способов, описанных выше. Набор может содержать слитый белок с SEQ ID NO: 1 (предоставляемый, например, в стерильном контейнере), который может находиться в форме фармацевтической композиции, подходящей для введения субъекту.

Фармацевтическая композиция может предоставляться в форме, готовой к применению, или в форме, требующей, например, восстановления или разбавления перед введением. Когда композиции находятся в форме, которая должна быть восстановлена пользователем, набор также может содержать буферы, фармацевтически приемлемые эксципиенты и т. п., упакованные с или отдельно со слитым белком с SEQ ID NO: 1. Когда предусмотрена комбинированная терапия (например, слитым белком с SEQ ID NO: 1 и ингибитором(ами) иммунных контрольных точек, набор может содержать несколько агентов отдельно, или же они могут уже быть объединены в наборе. Аналогично, когда необходима дополнительная комплементарная терапия (например, слитым белком с SEQ ID NO: 1, ингибитором(ами) иммунных контрольных точек и соединением или агентом для дополнительной комплементарной терапии), набор может содержать несколько агентов отдельно, или же два или более из них могут уже быть объединены в наборе.

Набор по изобретению может быть сконструирован для условий, необходимых для надлежащего обслуживания размещенных в нем компонентов (например, охлаждение или замораживание). Набор может содержать этикетку или вкладыш в упаковку, включающий идентификационную информацию для содержащихся в нем компонентов и инструкции по их применению (например, параметры дозирования, клиническую фармакологию активного(ых) ингредиента(ов), включительно с механизмом(ами) действия, фармакокинетикой и фармакодинамикой, 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 сроки годности. Этикетка или вкладыш в упаковку могут быть, например, встроены в физическую структуру, в которой размещены компоненты, содержаться отдельно внутри физической структуры или прикрепляться к компоненту набора (например, ампуле,

шприцу или флакону).

Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать , или быть встроенными в, машиночитаемый носитель, такой как диск (например, жесткий диск, карта, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитная лента или электрические носители данных, такие как RAM и ROM, или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители данных, флэш-носители или карты памяти. В некоторых вариантах осуществления фактические инструкции отсутствуют в наборе, но предусмотрены средства для получения инструкций из удаленного источника, например, через интернет-сайт.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры представлены в иллюстративных целях и не должны истолковываться как каким-либо образом ограничивающие объем данного изобретения.

Пример 1 - Ленватиниб в комбинации с SEQ ID NO: 2.

Цели:

Оценка противоопухолевой эффективности ленватиниба, слитого белка с SEQ ID NO: 2 (мышинной ортологичной конструкции слитого белка с SEQ ID NO: 1) и комбинации двух агентов в сингенных мышинных моделях рака (линия клеток рака толстой кишки мышей, MC38 у самок мышей C57BL/6).

Конструирование SEQ ID NO: 2:

Получали последовательности IL-2 и IL2Ra мыши (UniProtKB-P04351 и P01590, соответственно) и использовали выравнивания последовательностей мыши и человека (UniProtKB P60568 и P01589) для картирования последовательностей мыши с последовательностью IL-2 человека, подвергшейся круговой перестановке, представленной в SEQ ID NO: 1.

Полученный в результате мышинный ортолог SEQ ID NO: 2 имеет следующую аминокислотную последовательность:

SKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIS
TSPQGGSSSTQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKD
LQCLEDELGPLRHVLDLTQSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGF
RRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNHDKSRKQVTAQLEHQKEQQT TTD MQKPTQSM
HQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKT
GWTQPQLTCVDGSHNNNNN (SEQ ID NO: 2).

His-тег на C-конце SEQ ID NO: 2 используется для очистки и может присутствовать в экспрессируемом белке или, необязательно, может быть удален. Конструкция, используемая для рекомбинантного получения белка, может необязательно включать сигнальный пептид, например, сигнальный пептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность: MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 3).

План исследования:

В ходе исследований будет определено, может ли комбинированное лечение повысить эффективность монотерапии. Данные исследования включают многократные

дозы двух агентов для определения оптимальной дозы данной комбинации. Стандартные данные будут включать ингибирование роста опухолей и выживаемость. Животные модели, используемые для этого исследования, включают MC38 для того, чтобы установить, будет ли комбинация с SEQ ID NO: 2 в мышинных моделях помогать повышать чувствительность к ленватинибу.

Характеристики каждой исследуемой группы животных, введение тестируемых препаратов и временные параметры, сбор образцов и общий план исследования представлены в таблицах 1 и 2:

Таблица 1

Группа	n	Схема лечения 1				Схема лечения 2			
		Агент	мг/кг	Путь введения	Схема лечения	Агент	мг/кг	Путь введения	Схема лечения
1	10	несущая среда 1	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	несущая среда 2	—	п/о	qd x 28
2	10	несущая среда 1	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	Ленватиниб	10	п/о	qd x 28
3	10	несущая среда 1	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	Ленватиниб	30	п/о	qd x 28
4	10	несущая среда 1	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	Ленватиниб	100	п/о	qd x 28
5	10	SEQ ID NO:2	3	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	несущая среда 2	—	п/о	qd x 28
6	10	SEQ ID NO:2	3	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	Ленватиниб	10	п/о	qd x 28

Таблица 2

Группа	n	Режим обработки				Медiana TTE	T-C	%TGD	Статистическая значимость		MTV (n) 53-е сутки	регрессия			Средняя MT Низкий уровень	Летальные исходы	
		Агент	мг/кг	Путь введения	Схема лечения				vs G1	vs G6		PR	CR	TFS		TR	NTRu
1	9	несущая среда 1 несущая среда 2	---	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	14,3	---	---	---	---	0	0	0	---	0	1	
2	8	Несущая среда 1 Ленватиниб	---	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	38,3	24,0	168	***	---	---	1	0	0	---	0	2
3	9	Несущая среда 1 Ленватиниб	---	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	37,4	23,1	162	---	---	---	0	0	0	---	0	1
4	9	несущая среда 1 Ленватиниб	---	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	37,7	23,4	164	---	---	---	0	0	0	---	0	1
5	9	SEQ ID NO:2 несущая среда 2	3	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	16,4	2,1	15	*	---	---	0	0	0	---	0	1
6	7	SEQ ID NO:2 ленватиниб	3 10	п/к п/о	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 qd x 28	51,0	36,7	257	---	---	4(3)	2	3	3	2,8% 6-е сутки	0	3

В таблице 2 приведена запланированная схема лечения по завершению исследования.

носитель 1 = ФСБ

носитель 2 = 0,5% метилцеллюлоза; 0,5% Твин 20 в солевом растворе

Конечная точка исследования = 1000 мм³; длительность исследования = 53 дня

n = число животных в группе, которые не умерли по случайным или неизвестным причинам или не были умерщвлены для получения образцов

ВКТ = время до конечной точки, T-C = разница между медианным ВКТ (в днях) обработанной и контрольной группы, %ЗРТ = [(T-C)/C] x 100

Максимальная T-C в этом исследовании составляет 38,7 дня (271%) по сравнению с группой 1

Статистическая значимость (логранговый критерий): no = не подлежит оценке, nz = не значимый, * = P < 0,05, ** = P < 0,01, *** = P < 0,001 по сравнению с группой 1 или указанной группой

МОО (n) = медианный объем опухоли (мм³) для числа животных в день проведения анализа ЗРТ (за исключением животных с объемом опухоли в конечный момент)

ЧР = частичная регрессия; ПР = общее число случаев полной регрессии; ВБО = выжившие без опухолей, т. е. объем опухоли ≤ 13,5 мм³ для последних трех измерений в исследовании

Средний минимум MT = наименьшая средняя масса тела по группе в виде % изменения относительно дня 1; --- указывает на отсутствие наблюдаемого снижения средней массы тела

СЛ = связанная с лечением смерть; НСЛн = не связанная с лечением смерть неизвестной этиологии

Мыши

Самки мышей C57BL/6 m (C57BL/6 N Ctrl Charles River) имели возраст девять недель в день 1 исследования и имели диапазон массы тела (МТ) от 17,8 до 26,7 г. Животным давали воду без ограничений (обратный осмос, 1 м. д. Cl) и модифицированный и облученный корм NIH 31[®], состоящий из 18,0% сырого белка, 5,0% сырого жира и 5,0% сырой клетчатки. Мыши также получали добавку Diet Gel по прибытии и в течение данного исследования. Мышей содержали на облученной подстилке Enrich-o'cobs[™] в статических микроизоляторах с 12-часовым световым циклом при температуре 20-22°C (68-72°F) и влажности 40-60%. Charles River Discovery Services, Северная Каролина, США (CR Discovery Services), строго соблюдает рекомендации *Руководства по уходу и использованию лабораторных животных* в отношении ограничений, содержания, хирургических процедур, регулирования приема пищи и жидкости, а также ветеринарной помощи. Программа по уходу за животными и их использованию в CR Discovery Services аккредитована Международной ассоциацией по оценке и аккредитации в области ухода за лабораторными животными (AAALAC), что обеспечивает соблюдение принятых стандартов ухода за лабораторными животными и их использования.

Культура опухолевых клеток

Клетки карциномы толстой кишки мыши MC38 выращивали до середины экспоненциальной фазы роста в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина, 100 ед/мл пенициллина G, 100 µг/мл сульфата стрептомицина и 25 µг/мл гентамицина. Опухолевые клетки культивировали в сосудах для тканевых культур во влажном инкубаторе при 37°C, в атмосфере из 5% CO₂ и 95% воздуха.

Имплантация in vivo

В день имплантации клетки MC38 собирали во время экспоненциальной фазы роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в концентрации 5×10⁶ клеток/мл. Мышей анестезировали изофлураном и инициировали опухоли путем подкожной имплантации 5×10⁵ клеток MC38 (в 0,1 мл суспензии) в правый бок каждого исследуемого животного. Опухоли отслеживали по мере приближения их объемов к целевому диапазону 80-120 мм³. Опухоли измеряли в двух направлениях с использованием штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w=ширина и l=длина опухоли в мм. Массу опухоли можно оценить, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли. Через четырнадцать суток после имплантации опухоли, в момент времени, обозначенный как 1-е сутки

исследования, животных разделяли на тринадцать групп (группы 1-12: n=10, группа 13: n=5) с индивидуальными объемами опухолей, варьирующимися в диапазоне от 75 до 144 мм³, и средними групповыми объемами опухолей, варьирующимися в диапазоне от 102 до 104 мм³.

Терапевтические агенты

Ленватиниб хранили при температуре окружающей среды с защитой от света, а SEQ ID NO: 2 хранили в виде 3,03 мг/мл исходного раствора -80°C с защитой от света. Каждую неделю ленватиниб составляли в носителе 2 (0,5% метилцеллюлозы (МЦ) и 0,5% полисорбата-20 в солевом растворе в деионизированной (ДИ) воде) для получения 10 мг/мл прозрачного бесцветного раствора для дозирования, который доставлял 100 мг/кг при введении в объеме дозирования 10 мл/кг (0,2 мл/20 г мыши), с поправкой на массу тела каждого животного. Дополнительные аликвоты 10 мг/мл раствора дополнительно разводили носителем 2 до концентраций 3 и 1 мг/мл, что обеспечивало дозировки 30 и 10 мг/кг, соответственно, при введении в объеме дозирования 10 мл/кг. Растворы для дозирования защищали от света и постоянно перемешивали при комнатной температуре до и во время введения доз.

SEQ ID NO: 2 в виде исходного раствора размораживали и аликвотировали для использования в течение недели. В каждый день введения доз аликвоты разводили в носителе 1 (стерильный ФСБ, pH 7,4) и выдерживали при температуре 4°C с защитой от света до введения, чтобы получить 0,3 мг/мл растворы для дозирования, которые доставляли 3 мг/кг при введении в объеме дозирования 10 мл/кг, с поправкой на массу тела каждого животного.

Обработка

В день 1 исследования мышей с развившимися подкожными опухолями MC38 сортировали в шесть групп (n=10). Введение доз начинали в соответствии с планом обработки, изложенным в таблицах 1 и 2. Носитель 1 (ФСБ) и SEQ ID NO: 2 в дозе 3 мг/кг вводили подкожно (п/к) в дорсальную лопаточную область; носитель 2 и ленватиниб вводили перорально (п/о) в течение 28 дней (gd x 28); все агенты вводили в объеме 10 мл/кг (0,2 мл/20 г мыши) в соответствии с массой тела каждого животного.

Группа 1 получала носитель 1 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и носитель 2 п/о qd x 28.

Группа 2 получала носитель 1 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и 10 мг/кг ленватиниба п/о qd x 28.

Группа 3 получала носитель 1 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и 30 мг/кг ленватиниба п/о qd x 28.

Группа 4 получала носитель 1 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и 100 мг/кг ленватиниба п/о qd x 28.

Группа 5 получала 3 мг/кг SEQ ID NO: 2 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и носитель 2 п/о qd x 28.

Группа 6 получала 3 мг/кг SEQ ID NO: 2 п/к в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16 и 19 и 10 мг/кг

ленватиниба п/о qd x 28.

Сбор образцов

Через два часа после первой дозы брали кровь без анестезии у животных 1-5 в группах 2, 3, 4 и 6. Путем забора крови из нижнечелюстной области получали по 0,25 мл крови и обрабатывали для выделения плазмы в антикоагулянте -K2EDTA. Образцы быстро замораживали и держали в условиях перевозки при -80 °С на сухом льду.

Конечная точка задержки роста опухоли

Конечной точкой исследования был объем опухоли 1000 мм³ или день 53 в зависимости от того, что наступало раньше. Каждое животное умерщвляли для оценки прогрессирования опухоли (ПО), когда его опухоль достигала конечной точки объема. Время до конечной точки (ВКТ) для каждого животного рассчитывали по следующему уравнению:

$$TTE(\text{сутки}) = \frac{\log_{10}(\text{конечная точка, мм}^3) - b}{m}$$

где b представляет собой отсекаемый отрезок, а m представляет собой наклон линии, полученной с помощью линейной регрессии \log -трансформированных данных по росту опухоли. Набор данных состоит из первого результата, который превышает конечную точку объема в исследовании, и трех последовательных результатов, которые непосредственно предшествуют достижению конечной точки объема. Любое животное, которое не достигло конечной точки объема, умерщвляли в конце исследования и приписывали ему значение ВКТ, соответствующее последнему дню исследования. В случаях, в которых \log -трансформированное рассчитанное ВКТ предшествовало дню перед достижением конечной точки или превышало значение в день достижения конечной точки объема опухоли, проводили линейную интерполяцию, чтобы аппроксимировать ВКТ. Любому животному, определенному как умершее по связанным с лечением причинам (СЛ), приписывали значение ВКТ, соответствующее дню смерти, тогда как любое животное, умершее по не связанным с лечением причинам (НСЛ), исключали из анализа.

Результат обработки оценивали по задержке роста опухоли (ЗРТ), которую определяли как увеличение медианного ВКТ для обработанной группы по сравнению с контрольной группой.

$$ЗРТ = T - C,$$

выраженное в днях или в виде процента от медианного ВКТ контрольной группы:

$$\%TGD = \frac{T-C}{C} \times 100 \text{ где}$$

T=медианное ВКТ для обработанной группы,

C=медианное ВКТ для контрольной группы.

Медианный объем опухоли (МОО) и критерии регрессии

Эффективность обработки также оценивают по объему опухолей животных, оставшихся в исследовании в последний день, и по числу и силе ответов регрессии. МОО (n) определяют как медианный объем опухоли в последний день исследования среди оставшихся подлежащих оценке животных n, опухоли которых не достигли конечной точки объема.

Обработка может вызвать частичную регрессию (ЧР) или полную регрессию (ПР) опухоли у животного. В ответе ЧР объем опухоли составляет 50% или менее от ее объема в день 1 для трех последовательных измерений в ходе исследования и равен или превышает 13,5 мм³ для одного или более из этих трех измерений. В ответе ПР объем опухоли составляет менее 13,5 мм³ для трех последовательных измерений во время исследования. Животных оценивали только один раз во время исследования в отношении события ЧР или ПР и только как ПР, если были удовлетворены как критерии ЧР, так и ПР. Любое животное с ответом ПР в конце исследования дополнительно классифицировали как выжившее без опухоли (ВБО). За животными наблюдали в отношении ответов регрессии.

Токсичность

Животных взвешивали ежедневно до дня 40, а затем дважды в неделю до конца исследования в день 53. В течение этого времени за мышами наблюдали в отношении явных признаков каких-либо нежелательных связанных с лечением (СЛ) побочных эффектов и записывали клинические признаки при наблюдении. Следили за индивидуальной массой тела (МТ) и умерщвляли любое животное с потерей массы, превышающей 30% для одного измерения или превышающей 25% для трех последовательных измерений, что считали СЛ смертью. Также следили за средней потерей массы тела по группе, а приемлемую токсичность определяли как среднюю потерю МТ по группе не более 15% во время исследования и как не более 10% СЛ смертей. Смерть классифицировали как СЛ, если она была связана с побочными эффектами обработки, о чем свидетельствовали клинические признаки и/или результаты вскрытия, и также классификацию СЛ приписывали случаям смерти по неизвестным причинам в течение 14 дней после введения последней дозы. Случаи смерти классифицировали как не связанные с лечением (НСЛ), если отсутствовали свидетельства связанных с лечением побочных эффектов. НСЛ случаи смерти дополнительно категоризировали следующим образом: НСЛс описывает случаи смерти вследствие

несчастных случаев или человеческой ошибки; НСЛм приписывали случаям смерти, произошедшей предположительно в результате распространения опухоли путем инвазии и/или метастазирования на основании результатов вскрытия; НСЛн описывает случаи смерти по неизвестным причинам, для которых отсутствуют доступные свидетельства связи смерти с метастазированием, прогрессированием опухоли, несчастным случаем или человеческой ошибкой. Следует отметить, что побочные эффекты лечения нельзя исключить из причин смерти, классифицированной как НСЛн.

Результаты:

Как показано на **Фиг. 2А** и **Фиг. 2В**, комбинация ленватиниба и мышинной ортологичной конструкции слитого белка с SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2), приводила к существенному снижению объема опухоли со временем и повышению % выживаемости. Кроме того, анализ генной экспрессии позволил выявить, что комбинация стимулировала экспрессию генов, связанных с иммунной цитолитической активностью (гранзима А и перфорина) в большей степени, чем любое соединение в отдельности. Экспрессия гена *Esm1*, связанного с активностью VEGF, также была снижена в сходной или большей степени в случае комбинации по сравнению в каждом соединением в отдельности (**Фиг. 3**). Комбинация продемонстрировала улучшения, которые более чем в два раза превышали эффекты каждого соединения в отдельности, что позволяет предположить наличие синергетических эффектов.

Комбинация IL-2R-селективного цитокина с промежуточной аффинностью и ленватиниба приводит к устойчивой дозозависимой противоопухолевой эффективности в сингенной мышинной модели рака толстой кишки.

Пример 2 - Антитело к VEGF в комбинации с SEQ ID NO: 2.

Цели:

Оценка противоопухолевой эффективности антитела к VEGF, слитого белка с SEQ ID NO: 2 (мышинной ортологичной конструкции слитого белка с SEQ ID NO: 1) и комбинации двух агентов в сингенных мышинных моделях рака (линия клеток рака толстой кишки мышей, MC38 у самок мышей C57BL/6).

Используемое в этом исследовании антитело к VEGF было описано в Liang et al (J. Biol. Chem. 281(2): 951-961. 2006) как клон антитела G6-31.

План исследования:

В ходе исследований будет определено, может ли комбинированное лечение повысить эффективность монотерапии. Эти исследования включают многократные дозы двух агентов для определения оптимальной дозы данной комбинации. Стандартные данные будут включать ингибирование роста опухолей и выживаемость. Животные модели, используемые для этого исследования, включают MC38 для того, чтобы установить, будет ли комбинация с SEQ ID NO: 2 в мышинных моделях помогать повышать чувствительность к антителу к VEGF.

Характеристики каждой исследуемой группы животных, введение тестируемых препаратов и временные параметры, сбор образцов и общий план исследования

представлены в таблицах 3 и 4:

Таблица 3 - Дизайн исследования

Группа	n	Схема лечения 1				Схема лечения 2			
		Агент	мл/кг	Путь введения	Схема лечения	Агент	мл/кг	Путь введения	Схема лечения
1	10	несущая среда	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	несущая среда	—	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21
2	10	несущая среда	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	анти-VEGF-АКМ	1	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21
3	10	несущая среда	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	анти-VEGF-АКМ	5	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21
4	10	несущая среда	—	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	анти-VEGF-АКМ	10	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21
5	10	SEQ ID NO:2	3	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	несущая среда	—	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21
6	10	SEQ ID NO:2	3	п/к	Сутки 1,4,7,10,13,16,19	анти-VEGF-АКМ	5	в/бр	Сутки 1,4,8,11,15,18,21

В таблице 1 показан дизайн исследования по состоянию на 1-й день исследования.
несущая среда = PBS

Таблица 4 - Краткое описание ответа по исследованию примера 2

Группа	n	Режим обработки				Медиана TTE	T-C	%TGD	Статистическая значимость				MTV (n) 47-е сутки	регрессия			Средний MT Надир		Летальные исходы	
		Агент	мл/кг	Путь введения	Схема лечения				vs G1	vs G2	vs G4	vs G6		PR	CR	TFS	TR	MTRn		
1	10	несущая среда несущая среда	—	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	164	—	—	—	***	***	***	—	0	0	0	—	0	0	
2	8	несущая среда анти-VEGF-АКМ	—	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	20,8	4,6	28	***	—	**	—	—	0	0	0	—	0	2	
3	9	несущая среда анти-VEGF-АКМ	—	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	23,9	7,7	48	***	нз	нз	***	—	0	0	0	-0,5% 2-е сутки	0	1	
4	10	несущая среда анти-VEGF-АКМ	—	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	264	10,0	62	***	**	—	—	—	0	0	0	-1,2% 2-е сутки	0	0	
5	10	SEQ ID NO:2 несущая среда	3	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	21,7	5,5	34	***	—	—	***	—	0	0	0	—	0	0	
6	9	SEQ ID NO:2 анти-VEGF-АКМ	3 5	п/к в/бр	Сутки 1,4,7,10,13,16,19 Сутки 1,4,8,11,15,18,21	38,4	224	137	***	—	—	—	333(2)	0	1	1	—	0	1	

В таблице 2 показан запланированный режим лечения по завершении исследования.

несущая среда = PBS

Конечная точка исследования=1000 мм³; длительность исследования=47 дней

n=число животных в группе, которые не умерли по случайным или неизвестным причинам или не были умерщвлены для получения образцов

ВКТ=время до конечной точки, T-C=разница между медианным ВКТ (в днях) обработанной и контрольной группы, %ЗРТ=[(T-C)/C] x 100

Максимальная T-C в этом исследовании составляет 30,8 дня (190%) по сравнению с группой 1

Статистическая значимость (логранговый критерий): нз=не подлежит оценке, нз=не значимый, *=P < 0,05, **=P < 0,01, ***=P < 0,001 по сравнению с группой 1 или указанной группой

МОО (n)=медианный объем опухоли (мм³) для числа животных в день проведения анализа ЗРТ (за исключением животных с объемом опухолей в конечный момент)

ЧР=частичная регрессия; ПР=общее число случаев полной регрессии; ВБО=выжившие без опухолей, т. е. объем опухоли ≤ 13,5 мм³ для последних трех измерений в исследовании

Средний минимум MT=наименьшая средняя масса тела по группе в виде %

изменения относительно дня 1; --- указывает на отсутствие наблюдаемого снижения средней массы тела

СЛ=связанная с лечением смерть; НСЛн=не связанная с лечением смерть неизвестной этиологии

Терапевтические агенты

SEQ ID NO: 2 получали, как описано в примере 1.

Исходный раствор антитела к VEGF (анти-VEGF-АКМ) размораживали и аликвотировали для использования в течение недели. В каждый день введения доз аликвоты разводили в носителе (стерильный ФСБ, рН 7,4) и выдерживали при температуре 4°C с защитой от света до введения, чтобы получить 1,0, 0,5 и 0,1 мг/мл растворы для дозирования, которые доставляли 10, 5, 1 мг/кг при введении в объеме дозирования 10 мл/кг, с поправкой на массу тела каждого животного.

Воздействие

В день 1 исследования мышей с развившимися подкожными опухолями МС38 сортировали в шесть групп (n=10). Введение доз начинали в соответствии с планом обработки, изложенным в таблице 3, а конечные схемы введения доз изложены в таблице 4. Носитель и SEQ ID NO: 2 в дозе 3 мг/кг вводили подкожно (п/к) в дорсальную лопаточную область в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19; носитель и анти-VEGF-АКМ вводили внутривенно (в/в) в дни 1, 4, 8, 11, 15, 18, 21; все агенты вводили в объеме 10 мл/кг (0,2 мл/20 г мыши) в соответствии с массой тела каждого животного.

Группа 1 получала носитель в обеих схемах.

Группа 2 получала носитель в комбинации с 1 мг/кг анти-VEGF-АКМ.

Группа 3 получала носитель в комбинации с 5 мг/кг анти-VEGF-АКМ.

Группа 4 получала носитель в комбинации с 10 мг/кг анти-VEGF-АКМ.

Группа 5 получала 3 мг/кг SEQ ID NO: 2 в комбинации с носителем.

Группа 6 получала 3 мг/кг SEQ ID NO: 2 в комбинации с 5 мг/кг анти-VEGF-АКМ.

Сбор образцов

Через четыре часа после первой дозы, четыре часа после анти-VEGF-АКМ (день 18) и четырнадцать дней после последнего введения анти-VEGF-АКМ (день 35) без анестезии брали кровь у всех животных в группах 2, 3, 4 и 6. Путем забора крови из нижнечелюстной области получали по 0,2 мл крови и обрабатывали для выделения сыворотки, быстро замораживали и держали в условиях перевозки при -80 °C на сухом льду. В конечный момент времени получали опухоль от 5 животных на группу. Опухоли взвешивали и консервировали с помощью RNA-later и держали в условиях перевозки при -4 °C в холодных упаковках.

Результаты:

Как показано на **Фиг. 1А** и **Фиг. 1В**, комбинация антитела к VEGF и мышинной ортологичной конструкции слитого белка с SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2), приводила к существенному снижению объема опухоли со временем и повышению % выживаемости. Комбинация продемонстрировала улучшения, которые более чем в два раза превышали

эффекты каждого соединения в отдельности, что позволяет предположить наличие синергетических эффектов.

Комбинация IL-2R-селективного цитокина с промежуточной аффинностью и антитела к VEGF приводит к устойчивой дозозависимой противоопухолевой эффективности в сингенной мышинной модели рака толстой кишки.

Патентная и научная литература, цитируемая в данном документе, очерчивает знания, доступные специалистам в данной области техники. Все патенты США и опубликованные или неопубликованные заявки на патенты США, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки. Все опубликованные иностранные патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки. Все другие опубликованные источники, документы, рукописи и научная литература, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки.

Несмотря на то, что данное изобретение было конкретным образом представлено и описано со ссылкой на предпочтительные варианты его осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, без отступления от объема данного изобретения, охватываемого прилагаемой формулой изобретения. Также следует понимать, что ни один из вариантов осуществления, описанных в данном документе, не является взаимоисключающим и может комбинироваться различными способами без отступления от объема данного изобретения, охватываемого прилагаемой формулой данного изобретения.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

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

i) введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 или его варианта, который является по меньшей мере на 80% идентичным SEQ ID NO: 1; и

ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза, выбранного из группы, состоящей из антитела, которое специфически связывается с VEGF, или ленватиниба;

при этом этап (i) выполняют до, после или одновременно с этапом (ii).

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что эффективное количество слитого белка с SEQ ID NO: 1 представляет собой количество, эффективное для активации промежуточного рецептора IL-2, IL-2R $\beta\gamma$.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что слитый белок с SEQ ID NO: 1 вводят путем внутривенной или подкожной инъекции.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор ангиогенеза ингибирует более чем одну рецепторную тирозинкиназу.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что ингибитор ангиогенеза ингибирует одну или более из следующих рецепторных тирозинкиназ: рецепторы фактора роста эндотелия сосудов типов 1, 2 и 3; рецепторы тромбоцитарного фактора роста, рецепторы тромбоцитарного фактора роста типов альфа- и бета-, и рецепторы фактора роста фибробластов типов 1, 2 и 3.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ленватиниб вводят перорально.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток в опухолях и селезенке пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что повышение уровня CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере в 2 раза превышает таковое по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что повышение уровня регуляторных CD4⁺ Т-клеток (T_{reg}) или традиционных CD4⁺ Т-клеток у пациента отсутствует.

10. Способ по п. 7, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток и дендритных клеток в опухолях и селезенке пациента и к снижению уровня опухоль-ассоциированных макрофагов у пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества

ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток в опухолях и селезенке пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что повышение уровня CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере в 2 раза превышает таковое по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что повышение уровня регуляторных CD4⁺ Т-клеток (T_{reg}) у пациента отсутствует.

14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению уровня CD8⁺ Т-клеток и дендритных клеток в опухолях и селезенке пациента и к снижению уровня опухоль-ассоциированных макрофагов у пациента по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

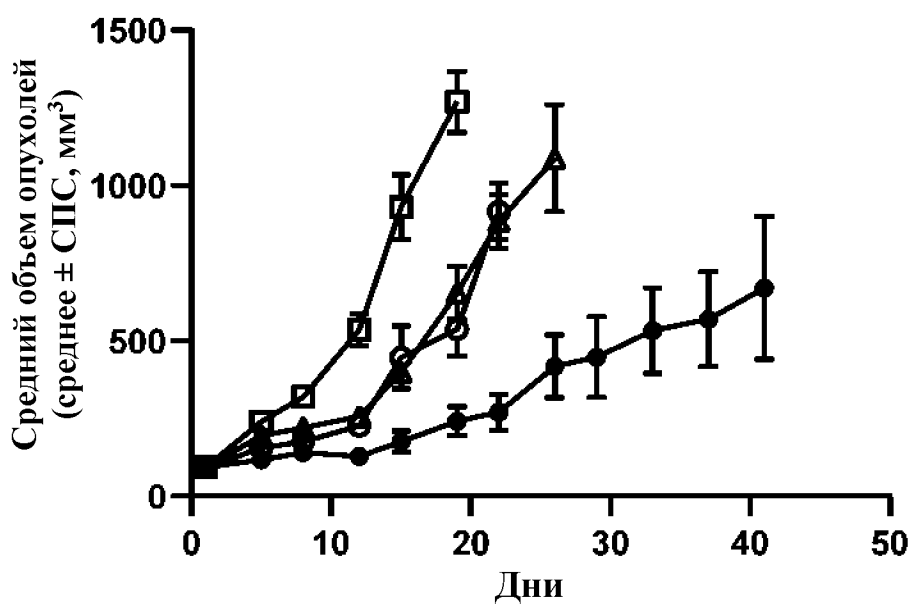
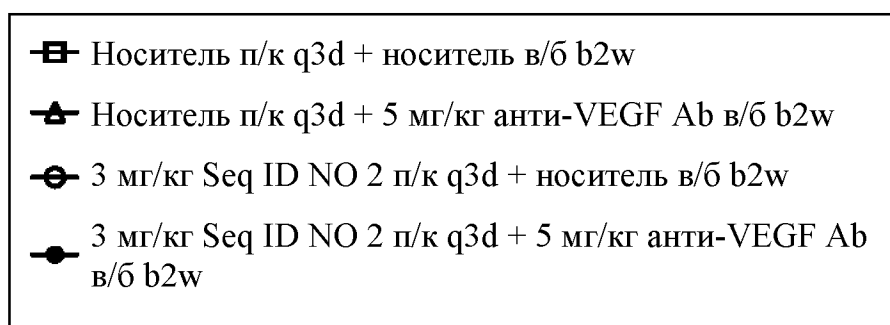
15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выживаемость без прогрессирования у пациента повышена по меньшей мере на 10% по сравнению с таковой при введении терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к повышению экспрессии генов, связанных с цитотоксической функцией иммунокомпетентных клеток, активацией Т-клеток и антигенной презентацией, по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

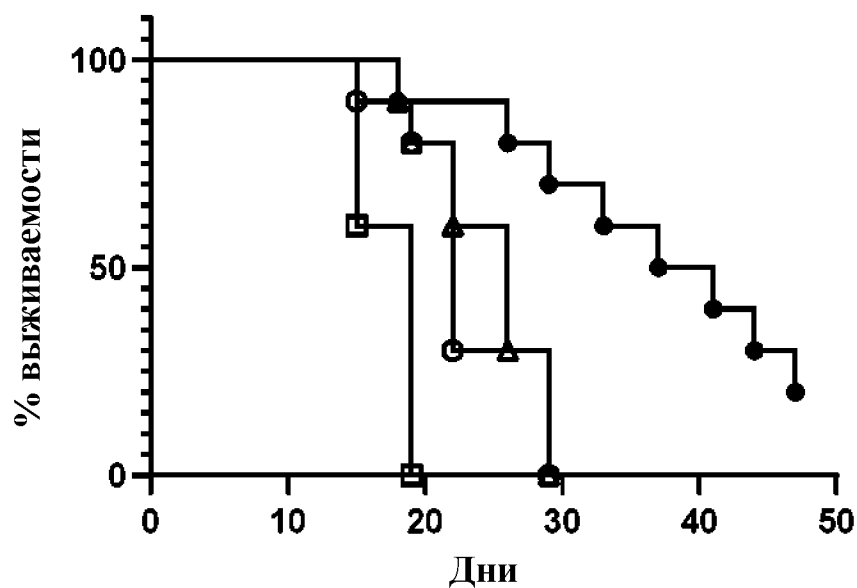
17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к снижению экспрессии Esm1 и повышению экспрессии генов, связанных с интерфероном типа I и интерфероном типа II, по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора ангиогенеза в качестве монотерапии.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что комбинация этапов (i) и (ii) приводит к изменениям в экспрессии большего общего числа генов по сравнению с введением терапевтически эффективного количества слитого белка с SEQ ID NO: 1 в качестве монотерапии или введением терапевтически эффективного количества ингибитора

ангиогенеза в качестве монотерапии.

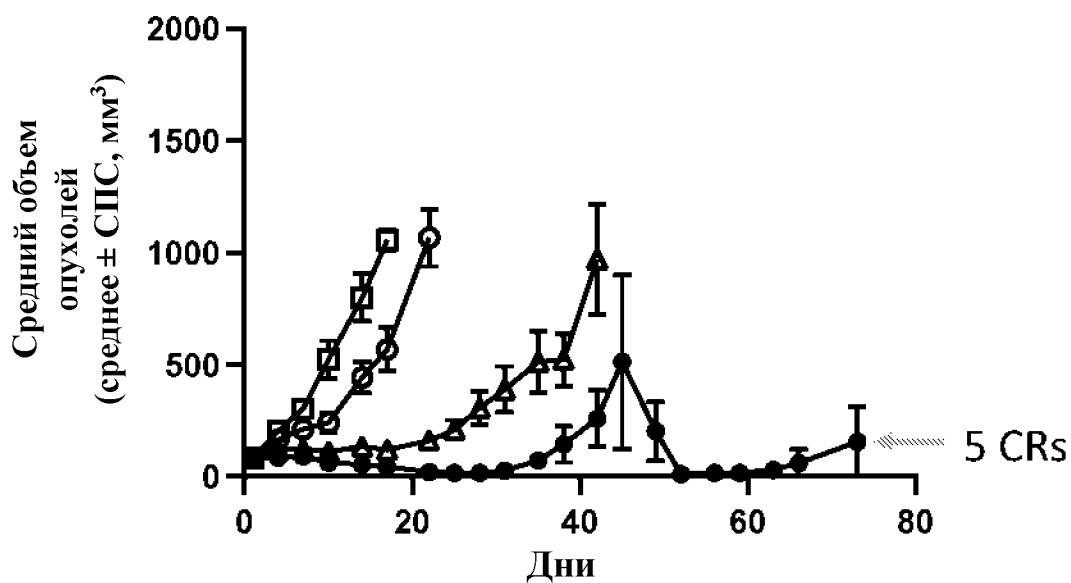


Фиг. 1А

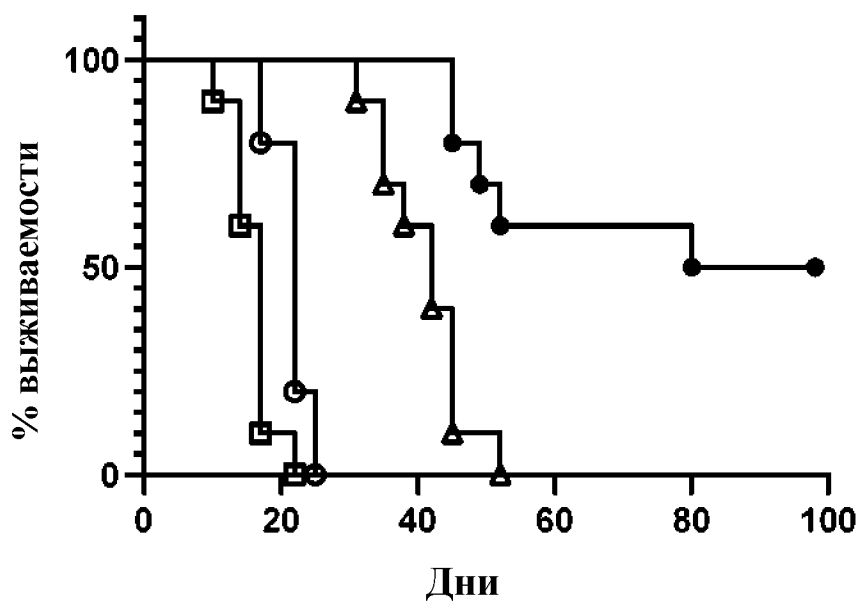


Фиг. 1В

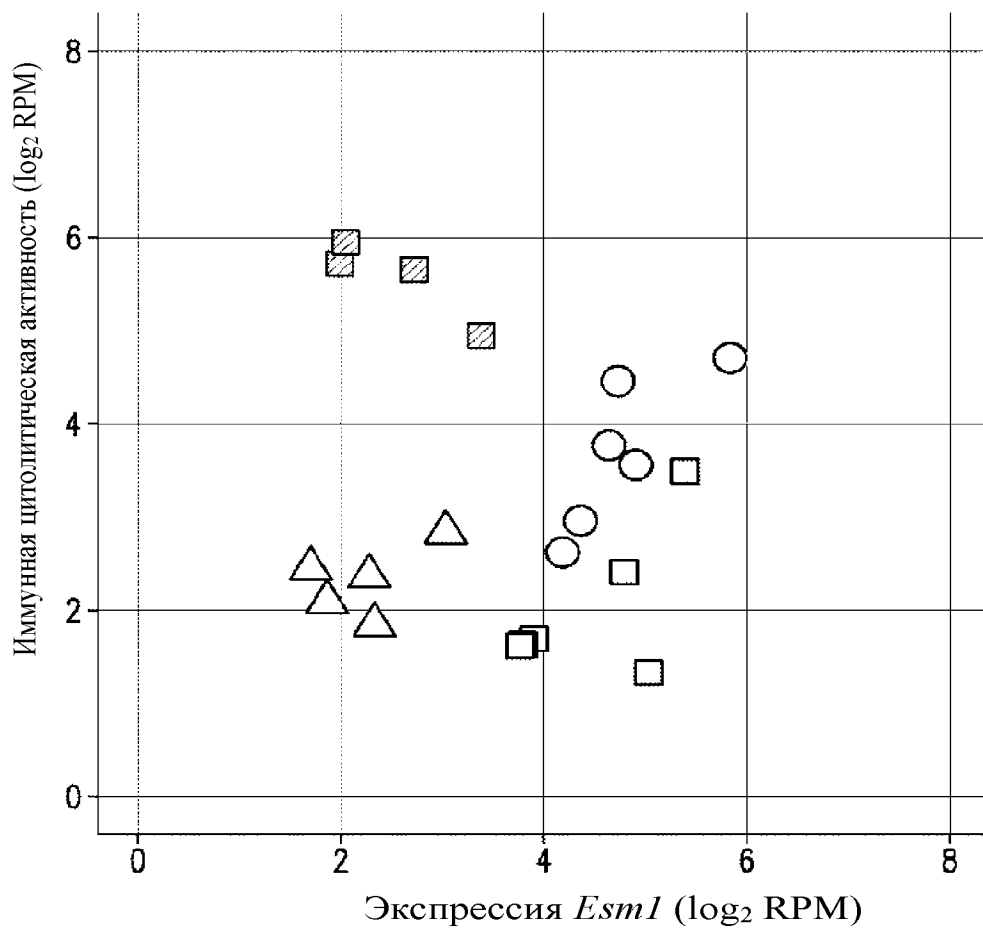
- ▣ Носитель п/к q3d + носитель п/о qd
- ▴ Носитель п/к q3d + 10 мг/кг ленватиниба п/о qd
- 3 мг/кг Seq ID NO 2 п/к q3d + носитель п/о qd
- 3 мг/кг Seq ID NO 2 п/к q3d + 10 мг/кг ленватиниба п/о qd



Фиг. 2А



Фиг. 2В



$$\text{Иммунная цитолитическая активность} = (Gzma + Prf1)/2$$

Обработка

□ Носитель

△ Ленватиниб

○ SEQ ID NO: 23 мг/кг

▨ SEQ ID NO: 23 мг/кг + ленватиниб

Фиг.3