

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036386**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.11.03**

**(21)** Номер заявки  
**201691866**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.03.20**

**(51)** Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)

---

**(54) ПРОНИКАЮЩИЕ В ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТЫ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

---

**(31)** 61/955,970; 61/973,002

**(32)** 2014.03.20; 2014.03.31

**(33)** US

**(43)** 2017.01.30

**(86)** PCT/US2015/021759

**(87)** WO 2015/143328 2015.09.24

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**Х. ЛИ МОФФИТТ КЭНСЕР СЕНТЕР  
ЭНД РИСЕЧ ИНСТИТЮТ,  
ИНК.; ЮНИВЕРСИТИ ОФ САУС  
ФЛОРИДА (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сарнейк Амод А, Пайлон-Томас  
Шари, Маклафлин Марк, Лю Хао  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев  
А.С., Хмара М.В., Дощечкина В.В.,  
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)**

**(56)** US-A1-20110091967  
WO-A2-2012127464  
WO-A1-2011053223  
DUDLEY, M.E. Adoptive Cell Transfer  
Therapy Following Non-Myeloablative but  
Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment  
of Patients with Refractory Metastatic Melanoma  
Journal of Clinical Oncology, Vol. 23, No.  
10, April 1, 2005, p. 2346-2357 [online]  
[retrieved on 2013-12-23]. Retrieved from  
the Internet <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/  
articles/PMC1475951/pdf/nihms-10166.pdf>, page 2,  
paragraph 3  
US-A1-20100189728

---

**(57)** В изобретении описываются композиции и способы наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo* с целью их применения при адоптивной клеточной терапии (АКТ). Также описываются композиции и способы идентификации агента для наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo* с целью их применения при АКТ. Также в изобретении предлагаются способы лечения рака с применением проникающих в опухоль лимфоцитов, выращенных с помощью описанных в изобретении способов.

---

**B1**

**036386**

**036386**

**B1**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

В настоящей заявке заявлен приоритет по предварительной заявке США № 61/955970, поданной 20 марта 2014 г., и по предварительной заявке США № 61/973002, поданной 31 марта 2014 г., которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Уровень техники**

Адоптивная клеточная терапия (АКТ) с применением проникающих в опухоль лимфоцитов (ПОЛ) является многообещающим способом иммунотерапии на основе Т-клеток. Получение ПОЛ включает хирургическую резекцию и наращивание ПОЛ из меланомных опухолей. После адекватного наращивания ПОЛ пациенты получают лимфодеструктивную химиотерапию, а ПОЛ адоптивно переносят с последующим введением высокой дозы ИЛ-2. Впервые эту схему применили в отделении хирургии Национального института рака для лечения метастатической меланомы и сообщили о частоте ответа у пролеченных пациентов около 50%, при этом ~ у 20% пациентов получили устойчивый полный ответ (Rosenberg S.A., et al. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2011, 17(13):4550-7). Впечатляющая устойчивость ответов на АКТ является отличительной чертой этого лечения и, как представляется, превосходит существующие методы лечения меланомы. АКТ зависит от инфильтрации опухоли Т-клетками перед сбором клеток, успешного наращивания ПОЛ *ex vivo* и мощной противоопухолевой эффекторной функции после переноса. Несмотря на то что АКТ с применением ПОЛ эффективна при меланоме, существует необходимость дальнейшего повышения показателей устойчивого ответа. Сокращение периода наращивания при начальном росте ПОЛ и усиление опухолеспецифичности наращенных ПОЛ может увеличить частоту ответа у пациентов, получающих аутологичные ПОЛ.

### **Сущность изобретения**

В настоящем документе описываются композиции и способы наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo* с целью их применения при адоптивной клеточной терапии (АКТ). В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают культивирование лимфоцитов с целью получения наращенных лимфоцитов в культуральной среде, содержащей агонист толл-подобного рецептора (TLR) в количестве, эффективном для усиления опухолеспецифичности наращенных лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают культивирование лимфоцитов с целью получения наращенных лимфоцитов в питательной среде, содержащей стимулирующий пептид и пептидомиметик. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидомиметик представляет собой пептоид или пептидо-пептоидный гибрид. В некоторых вариантах реализации изобретения пептоид или пептидо-пептоидный гибрид стабилизирован углеводородной сшивкой.

Также в изобретении предлагаются способы лечения рака с использованием проникающих в опухоль лимфоцитов, наращенных с помощью описанных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают получение аутологичных проникающих в опухоль лимфоцитов от субъекта, культивирование лимфоцитов в культуральной среде, содержащей агонист толл-подобного рецептора (TLR), с целью получения наращенных лимфоцитов, лечение субъекта немиелоаблативной противолимфомной химиотерапией и введение наращенных лимфоцитов млекопитающему.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых случаях рак представляет собой меланому, рак яичников, рак молочной железы и колоректальный рак. Рак может быть метастатическим, рецидивирующим или их комбинацией.

Агонист TLR в некоторых вариантах реализации изобретения является лигандом для TLR, выбранным из группы, состоящей из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 и TLR9. Например, агонист TLR может быть лигандом, выбранным из группы, состоящей из Pam3CSK4, Pam3CSK4, поли I:C, рибомунилы и CpG-ODN.

Также описываются композиции и способы идентификации агента для наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo* с целью их применения при АКТ. Эти способы могут включать приведение в контакт проникающих в опухоль лимфоцитов с пригодным пептидом или пептидомиметиком из библиотеки пептидов или пептидомиметиков для определения способности селективно связывать проникающие в опухоль лимфоциты. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидомиметик представляет собой пептоид или пептидо-пептоидный гибрид. В некоторых вариантах реализации изобретения пептоид или пептидо-пептоидный гибрид стабилизирован углеводородной сшивкой. Способ может дополнительно включать скрининг влияния связывания пептида и пептидомиметика на пролиферацию проникающих в опухоль лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения идентификация пригодного пептида или пептидомиметика, которые увеличивает пролиферацию проникающих в опухоль лимфоцитов, идентифицирует агент для наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo*, применяемых при АКТ.

Агенты, выявленные с помощью этих способов, могут быть использованы для наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов, применяемых при АКТ.

Детали одного или более вариантов реализации настоящего изобретения изложены в прилагаемых графических материалах и в приведенном ниже описании. Другие характеристики, цели и преимущества

настоящего изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

### Описание графических материалов

На фиг. 1A-1D приведены примеры пептоидных тел.

На фиг. 2 приведена схема получения пептоидного тела, содержащего линкер, который связан со смолой, и второй линкер, содержащий пептоидно-пептоидную последовательность.

На фиг. 3 приведена схема получения пептоидного тела, содержащего линкер, который связан со смолой, и второй линкер, содержащий бета-изогнутый промотор.

На фиг. 4A-4C приведены примеры сшитых пептоидно-пептидных гибридов.

На фиг. 5 приведен пример планшета для позиционного сканирования библиотеки.

На фиг. 6 приведен пример схемы реакции для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки" с использованием мета-ксиленоловой группы.

На фиг. 7 приведен пример схемы реакции для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки" путем сшивания пропаргиловых боковых цепей, которые находятся на более проксимальных пептидных боковых цепях.

На фиг. 8 приведен пример схемы реакции для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки" с использованием азиды и алкина.

На фиг. 9 приведен пример схемы реакции для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки" с использованием реакции обмена метатезиса с замыканием цикла (RCM).

### Подробное описание сущности изобретения

Терапия на основе адоптивного клеточного переноса (АКТ) представляет собой очень эффективный метод иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью в организм пациентов с раком. АКТ является подходом к лечению, который включает идентификацию лимфоцитов с противоопухолевой активностью *in vitro*, наращивание этих клеток в больших количествах *in vitro* и их инфузию в организм хозяина, имеющего рак. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, могут быть получены из стромы резецированных опухолей (проникающие в опухоль лимфоциты или ПОЛ). Лимфоциты также могут быть получены или из крови, если они генетически сконструированы для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов (TCR) или рецепторов химерных антигенов (CARs), обогащенных смешанными лимфоцитарными культурами опухолевых клеток (MLTCs), или клонированы с использованием аутологичных антиген-представляющих клеток и пептидов, полученных из опухоли. АКТ, для которой лимфоциты получены от хозяина, имеющего рак и подлежащего инфузии, называется аутологичной АКТ. Патент США 2011/0052530 относится к способу проведения адоптивной клеточной терапии, способствующей регрессии рака, главным образом применяемой для лечения пациентов, страдающих от метастатической меланомы, что включено в качестве ссылки во всей своей полноте для этих способов.

В настоящем документе описываются композиции и способы наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов (ПОЛ) *ex vivo*, применяемых при АКТ. В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают культивирование лимфоцитов с целью получения наращенных лимфоцитов в культуральной среде, содержащей агонист толл-подобного рецептора (TLR) в количестве, эффективном для усиления опухолеспецифичности наращенных лимфоцитов. Агонист TLR в некоторых вариантах реализации изобретения является лигандом для TLR, выбранным из группы, состоящей из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 и TLR9. Например, агонист TLR может быть лигандом, выбранным из группы, состоящей из Pam3CSK4, Pam3CSK4, поли I:C, рибомунилы и CpG-ODN.

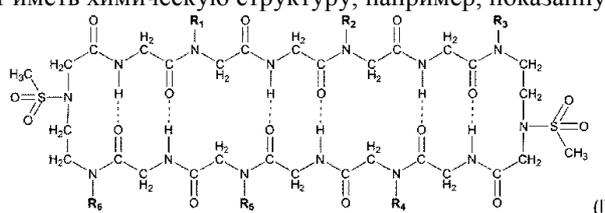
В других вариантах реализации изобретения способы включают культивирование лимфоцитов с целью получения наращенных лимфоцитов в культуральной среде, содержащей пептид или пептидомиметик в количестве, эффективном для усиления опухолеспецифичности наращенных лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидомиметик представляет собой пептоид или пептидо-пептоидный гибрид. В некоторых вариантах реализации изобретения пептоид или пептидо-пептоидный гибрид стабилизирован углеводородной сшивкой.

Пептоидная часть может обеспечить резистентность к протеолизу, а пептидная часть пептоидно-пептидных гибридов может способствовать достижению вторичной структуры по типу бета-"шпильки". Эти два содействия могут приводить к образованию гибрида, который является кандидатным потенциальным лекарственным препаратом для лечения, в котором протеолиз, как правило, является ограничением терапии.

Согласно настоящему описанию, эти пептидо-пептоидные гибриды могут также использоваться для наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов (ПОЛ) *ex vivo*, применяемых при АКТ.

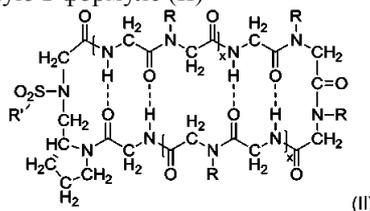
Примеры пептидо-пептоидного гибрида описаны в публикации WO 2013/192628 McLaughlin et al., которая включена в настоящее описание посредством ссылки для библиотеки пептоидных тел, описанных в ней. Пептоидные тела в WO 2013/192628 представляют собой циклические пептоидно-пептидные гибриды, которые могут обеспечить набор каркасов с использованием парного комбинаторного принципа. Циклические пептоидно-пептидные гибриды могут принимать вторичную структуру по типу бета-

"шпильки". Этот циклический дизайн по типу бета-"шпильки" является следствием преобразования пептидо-пептоидных субъединиц в двух антипараллельных бета-цепях. Например, описанный пептидо-пептоидный гибрид может иметь химическую структуру, например, показанную в формуле (I)



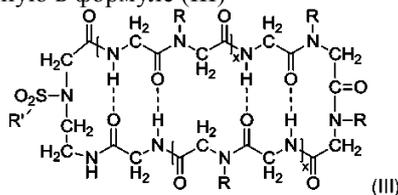
или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где  $R_1$ - $R_6$  представляют собой независимо органические группы.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (II)



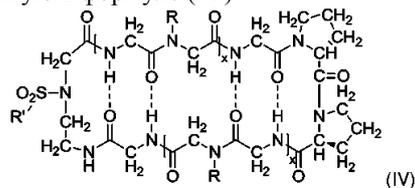
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (III)



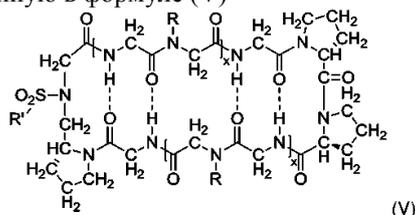
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (IV)



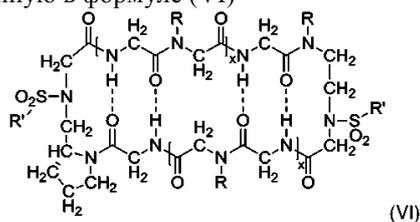
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (V)



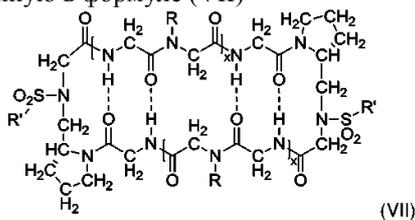
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (VI)



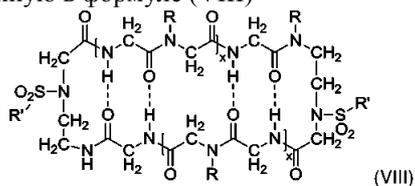
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (VII)



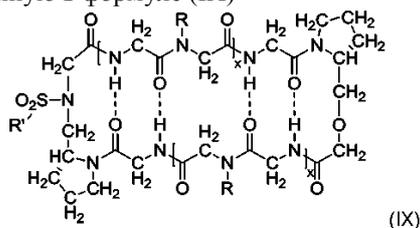
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (VIII)



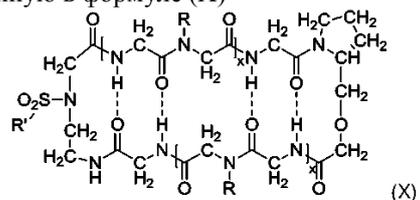
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (IX)



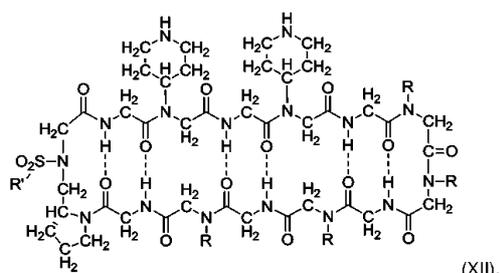
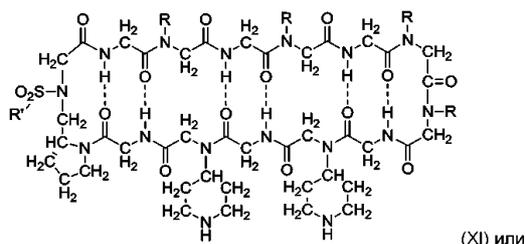
или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения циклические пептоидно-пептидные гибриды имеют химическую структуру, показанную в формуле (X)



или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой органическую группу или органическую мостиковую группу, связывающуюся со смолой или другим субстратом, а x равно от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения R-группы по меньшей мере из двух смежных пептоидно-глициновых последовательностей являются 4-пиперидиновыми группами, например соединенные формулы (II), где x равно 2



R-группы циклических пептоидно-пептидных гибридов формул (I)-(XII) выше могут быть практически любой структуры, вследствие чего не содержится фрагмент, который приводит к нарушению комплементарности водородных связей бета-складчатой структуры в пределах циклического пептоидно-пептидного гибрида. R-группа может быть эквивалентной боковым цепям аминокислот, неаминной части аминокислоты, или модифицированной неаминной части аминокислоты. R-группа может представлять собой сахар, такой как, моносахарид или дисахарид, или жирную кислоту, или модифицированные их вариации. R группа может представлять собой, но не ограничиваясь этим, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-гидроксиалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкоксиалкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-гидроксиалкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкенил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкенилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>-алкилоксиалкенил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-гидроксиарил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-аминоарил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкилоксиарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гидрокси-гетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-аминогетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гетероарилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>-алкоксигетероарил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-гидроксиалкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-аминоалкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкиларилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-алкоксиалкиларил, или химически трансформированный продукт любой из этих R-групп, такой как сложные эфиры, тиоэфиры, тиолы, амиды или сульфаниламиды, причем алкильные группы могут быть линейными, разветвленными, многократно разветвленными, циклическими или полициклическими. Например, R может представлять собой остаток первичного амина, который может быть, но не ограничиваясь этим, группами от включения 4-аминопиперидина, этаноламина, аллиламина, 1,4-диаминобутана, пиперониламина, 4-(2-аминоэтил)бензола, изобутиламина, триптамина, 4-морфолиноанилина, 5-амино-2-метоксипиперидина, (R)-метилбензиламина, 1-(2-аминопропил)-2-пирролидона, фурфуриламина, бензиламина, 4-хлорбензиламина, 4-метоксибензиламина, метоксиэтиламина, 2-аминоадипиновой кислоты, N-этиласпарагина, 3-аминоадипиновой кислоты, гидроксизина, бета-аланина, аллогидроксизин пропионовой кислоты, 2-аминомасляной кислоты, 3-гидроксипролина, 4-аминомасляной кислоты, 4-гидроксипролин пиперидиновой кислоты, 6-аминокапроновой кислоты, изодесмозина, 2-аминогептановой кислоты, аллоизолейцина, 2-аминоизомасляной кислоты, N-метилглицина, 3-аминоизомасляной кислоты, N-метилизолейцина, 2-аминопимелиновой кислоты, 6-N-метиллизина, 2,4-диаминомасляной кислоты, N-метилвалина, десмозина, норвалина, 2,2'-диаминопимелиновой кислоты, норлейцина, 2,3-диаминопропионовой кислоты, орнитина, N-этилглицина, или защищенных их эквивалентов, как пептоидный элемент N-R в циклическом пептоидно-пептидном гибриде.

В некоторых вариантах реализации изобретения пептоидно-пептидные гибриды могут изготавливаться на твердой подложке, такой как смола. Гибриды затем можно отщепить от смолы-подложки для использования в описанных способах. Фиг. 1 и 2 иллюстрируют пример пептоидно-пептидных гибридов в качестве смолы-связанных промежуточных продуктов.

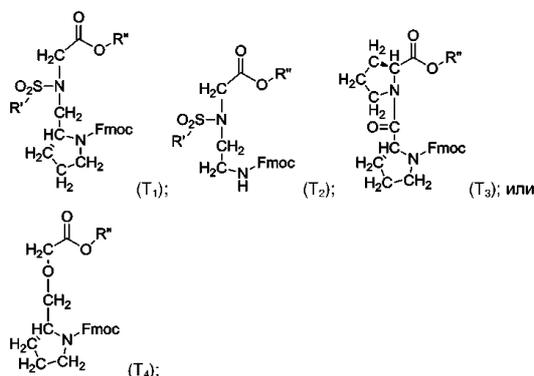
Пример пептоидно-пептидных гибридов.

Вариант реализации изобретения 1.

Пептоидно-пептидный гибрид, имеющий конформацию типа бета-"шпильки", содержит множество чередующихся пептоидно-пептидных последовательностей, каждая из которых имеет по меньшей мере один пептоидный остаток и аминокислотный остаток, причем пептоидно-пептидная последовательность образует по меньшей мере две антипараллельные бета-цепи между множеством линкеров и причем по меньшей мере один линкер представляет собой бета-изогнутый промотор.

Вариант реализации изобретения 2.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из линкеров представляет собой аминокислотный остаток от конденсации линкерного прекурсора, имеющего структуру



отличающуюся тем, что в ней R' представляет собой органическую группу или органическую мостиговую группу, связанную со смолой или другим субстратом, а R'' представляет собой H или защитную группу карбоновой кислоты.

Вариант реализации изобретения 3.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 2, отличающийся тем, что R'' представляет собой трет-бутил, аллил или бензил.

Вариант реализации изобретения 4.

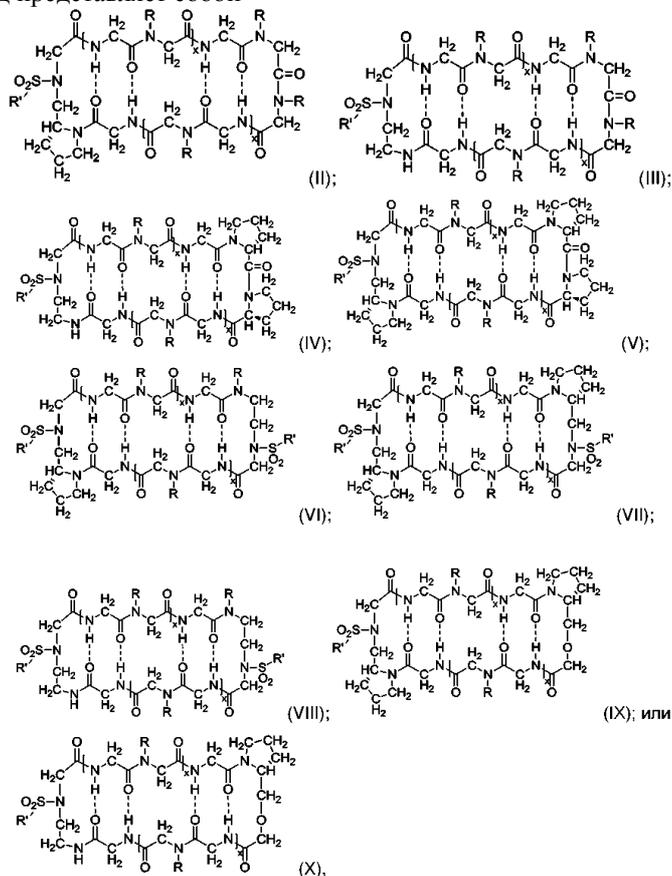
Гибрид согласно варианту реализации изобретения 2, отличающийся тем, что органическая мостиговая группа, связанная со смолой или другим субстратом, содержит -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-мостиговую группу.

Вариант реализации изобретения 5.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что один из линкеров состоит из двух пептоидных остатков.

Вариант реализации изобретения 6.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что циклический пептидно-пептидный гибрид представляет собой



где R-группы представляют собой независимо органические группы, R' представляет собой независимо органическую группу или органическую мостиговую группу, связанную со смолой, а x равно от 1

до 3.

Вариант реализации изобретения 7.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 6, отличающийся тем, что R представляет собой независимо C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-гидроксиалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкоксиалкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-гидроксиалкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкенил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкенилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>-алкилоксиалкенил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-гидроксиарил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-аминоарил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкилоксиарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гидроксигетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-аминогетероарил, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-гетероарилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>-алкоксигетероарил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-гидроксиалкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-аминоалкиларил, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-алкиларилзамещенную карбоновую кислоту, C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-алкоксиалкиларил или их химически трансформированную структуру.

Вариант реализации изобретения 8.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 7, отличающийся тем, что химически трансформированная структура содержит сложный эфир, сложный тиоэфир, тиол, амид или сульфаниламид.

Вариант реализации изобретения 9.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 6, отличающийся тем, что R независимо представляет собой остаток первичного амина: 4-аминопиперидина, этаноламина, аллиламина, 1,4-диаминобутана, пиперониламина, 4-(2-аминоэтил)бензола, изобутиламина, триптамина, 4-морфолиноанилина, 5-амино-2-метоксипиридина, (R)-метилбензиламина, 1-(2-аминопропил)-2-пирролидинона, фурфуриламина, бензиламина, 4-хлорбензиламина, 4-метоксибензиламина, метоксиэтиламина, 2-аминоадипиновой кислоты, N-этиласпарагина, 3-аминоадипиновой кислоты, гидроксизина, бета-аланина, аллогидроксизин пропионовой кислоты, 2-аминомасляной кислоты, 3-гидроксипролина, 4-аминомасляной кислоты, 4-гидроксипролин пиперидиновой кислоты, 6-аминокапроновой кислоты, изодесмозина, 2-аминогептановой кислоты, аллоизолейцина, 2-аминоизомаляной кислоты, N-метилглицина, 3-аминоизомаляной кислоты, N-метилизолейцина, 2-аминопимелиновой кислоты, 6-N-метиллизина, 2,4-диаминомасляной кислоты, N-метилвалина, десмозина, норвалина, 2,2'-диаминопимелиновой кислоты, норлейцина, 2,3-диаминопропионовой кислоты, орнитина, N-этилглицина или любых защищенных их эквивалентов.

Вариант реализации изобретения 10.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 6, отличающийся тем, что по меньшей мере один R представляет собой остаток 4-аминопиперидина.

Вариант реализации изобретения 11.

Гибрид согласно варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что все аминокислотные остатки являются остатками глицина.

Пептоидно-пептидные гибриды могут быть дополнительно стабилизированы путем перекрестного связывания между боковыми цепями аминокислот и/или N-замещений на глицинах и/или циклизации каркаса. Такие пептоиды в данном описании называются "сшитые пептоиды", в то время как такие пептоидно-пептидные гибриды в данном описании называются "сшитые пептоидно-пептидные гибриды".

Сшивание пептоидов и пептоидно-пептидных гибридов включает связь "боковая цепь к боковой цепи" и/или циклизацию каркаса для стабилизации пептоидов или пептоидно-пептидных гибридов. Таким образом, настоящее изобретение расширяет подход к вопросу стабилизации пептидов с использованием стабилизированных связей боковых цепей для стабилизации пептоидов или пептоидно-пептидных гибридов.

В контексте настоящего изобретения термин "боковая цепь" включает боковую цепь на аминокислоте, а также фрагмент, присоединенный к атому N N-замещенного глицина.

Могут быть разработаны несколько возможных связей "боковая цепь к боковой цепи" (далее по тексту "внутримолекулярное перекрестное связывание"). Внутримолекулярное перекрестное связывание между двумя боковыми цепями пептоидов или пептоидно-пептидных гибридов по настоящему изобретению может быть опосредовано химическими реакциями между боковыми цепями, которые также могут включать дополнительные химические вещества.

Например, внутримолекулярное перекрестное связывание может быть опосредовано химическим фрагментом, который не является частью боковых цепей и при этом боковые цепи соединяются друг с другом посредством химического фрагмента. Пример химического фрагмента, формирующего внутримолекулярное перекрестное связывание, описан в фиг. 6-9.

В некоторых вариантах реализации изобретения внутримолекулярное перекрестное связывание определяется принципом RCM (реакция обмена метатезиса с замыканием цикла) согласно реакции Aileron или Click (например, катализируемая медью 3 + 2 циклоприсоединение), описанные в патенте США № 5811515, который включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Пример внутримолекулярного перекрестного связывания, опосредованного принципом RCM, описан в фиг. 9.

В еще одном варианте реализации изобретения внутримолекулярное перекрестное связывание между двумя боковыми цепями устанавливается путем образования химической связи, например, с помощью реакции конденсации, между функциональными группами, присутствующими на боковых цепях. Реак-

ция конденсации представляет собой химическую реакцию, в которой две молекулы или фрагменты (функциональные группы) комбинируются с помощью химической связи, а реакция включает потерю одной или более меньших молекул. Примеры реакции конденсации между боковыми цепями, которые могут использоваться при внутримолекулярном перекрестном связывании согласно настоящему изобретению, хорошо известны специалистам с обычной квалификацией в данной области техники, причем такие варианты реализации находятся в пределах объема данного изобретения.

Дополнительные примеры пептоидов, соединенных определенными внутримолекулярным перекрестными связями, показаны на фиг. 4А-4С.

Дополнительные примеры перекрестных связей в пептидах описаны в патентах США №№ 8592377, 8324428, 8198405, 7786072, 7723469, 7192713, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Специалист с обычной квалификацией в данной области техники может предусмотреть использование различных перекрестных связей, описанных в этих патентных документах для получения сшитых пептоидов и сшитых пептоидно-пептидных гибридов согласно настоящему изобретению, причем такие варианты реализации находятся в пределах объема данного изобретения.

Соответственно в настоящем изобретении предлагается сшитый пептоид, содержащий множество N-замещенных глицинов, причем по меньшей мере два N-замещенных глицина связаны друг с другом с помощью внутримолекулярного перекрестного связывания и при этом длина и геометрия внутримолекулярной перекрестной связи обеспечивает стабильность пептоиду.

В некоторых случаях сшитый пептоидно-пептидный гибрид может содержать множество аминокислот и множество N-замещенных глицинов, причем по меньшей мере два остатка из множества аминокислот и множества N-замещенных глицинов связаны друг с другом с помощью внутримолекулярного перекрестного связывания, и при этом длина и геометрия внутримолекулярной перекрестной связи обеспечивает стабильность пептоидно-пептидному гибриду.

В одном варианте реализации изобретения два N-замещенных остатка глицина или два аминокислотных остатка связаны друг с другом посредством поперечной связи. В одном варианте реализации изобретения N-замещенный остаток связан с аминокислотным остатком посредством поперечной связи.

В еще одном варианте реализации изобретения сшитый пептоид-пептидный гибрид представляет собой циклический пептоидно-пептидный гибрид. Циклический пептоидно-пептид гибрида содержит множество чередующихся пептоидно-пептидных последовательностей, каждая из которых имеет по меньшей мере один пептоидный остаток и аминокислотный остаток, причем пептоидно-пептидные последовательности образуют по меньшей мере две антипараллельных бета-цепи.

В некоторых вариантах реализации изобретения внутримолекулярное перекрестное связывание представляет собой любое углеводородное перекрестное связывание.

В некоторых вариантах реализации изобретения пептоид или пептоидно-пептидный гибрид содержит более одной внутримолекулярной перекрестной связи, например две, три или четыре внутримолекулярных связи.

В некоторых вариантах реализации изобретения перекрестные связи расположены между двумя или более аминокислотными остатками или N-замещенными остатками глицина, размещенными на той же стороне бета-складчатости, что обеспечивает стабильность пептоиду или пептоидно-пептидному гибриду. В дополнительном варианте реализации изобретения внутримолекулярные перекрестные связи расположены между двумя или более аминокислотными остатками, или N-замещенными остатками глицина, размещенными на остатках бета-складчатого слоя, что обеспечивает стабильность пептоиду или пептоидно-пептидному гибриду.

В некоторых вариантах реализации изобретения боковая цепь может быть выбрана из циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного алкилена; циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного алкенилена; циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного алкинилена; циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного гетероалкилена; циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного гетероалкенилена; циклического или ациклического, разветвленного или неразветвленного, замещенного или незамещенного гетероалкенилена; замещенного или незамещенного арилена; замещенного или незамещенного гетероарилена или замещенного или незамещенного алкилена.

Дополнительные примеры боковых цепей и перекрестных связей, которые могут применяться в данном изобретении, описаны, например, в патенте США № 8592377 от столбца 37, строка 26 до столбца 43, строка 14; в патенте США № 8198405, от столбца 3, строка 54 до столбца 10, строка 2, и от столбца 25, строка 14 до столбца 26, строка 21; в патенте США № 7786072, от столбца 5, строка 44 до столбца 9, строка 43, и от столбца 11, строка 16 до столбца 12, строка 8; в патенте США № 7723469, от столбца 5, строка 30 до столбца 9, строка 12, и от столбца 24, строка 60 до столбца 26, строка 3; в патенте США № 7192713, от столбца 4, строка 26 до столбца 9, строка 45, и от столбца 11, строка 23 до столбца 12, строка

18.

Сшитые пептоиды, пептоидно-пептидные гибриды, сшитые циклические пептоидно-пептидные гибриды по настоящему изобретению могут также в некоторых случаях дополнительно содержать замещения аминокислоты в боковой цепи, и/или N-замещенные остатки глицина, причем замещения в боковой цепи дополнительно стабилизируют пептоиды, пептоидно-пептидные гибриды и циклические пептоидно-пептидные гибриды. Не ограничивающие примеры различных замещений, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, приведены в табл. 2.

Продукция проникающих в опухоль лимфоцитов (ПОЛ) осуществляется в 2 этапа: 1) этап предварительного REP (быстрое наращивание), на котором клетки выращивают на стандартных лабораторных средах, таких как RPMI, а ПОЛ обрабатывают w/реагентами, такими как облученные питающие клетки, а также антителами анти-CD3 для достижения желаемого эффекта; и 2) этап REP, на котором ПОЛ наращивают в достаточно большом количестве культуры, применяемой для лечения пациентов. Для этапа REP необходимы реагенты класса cGMP и 30-40 л культуральной среды. Тем не менее, на этапе предварительного REP могут быть использованы реагенты лабораторного класса (при допущении, что реагенты лабораторного класса разбавляются во время этапа REP), что облегчает возможность применения альтернативных стратегий с целью оптимизации продукции ПОЛ. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения описываются агонист TLR и/или пептид, или пептидомиметики, которые могут быть включены в культуральную среду на этапе предварительного REP.

АКТ может быть осуществлена путем (i) получения аутологических лимфоцитов от млекопитающих, (ii) культивирования аутологических лимфоцитов для получения наращенных лимфоцитов и (iii) введения наращенных лимфоцитов млекопитающему. Предпочтительно, чтобы лимфоциты были получены из опухоли, т.е. являлись ПОЛ, и были выделенными от млекопитающего, подлежащего лечению, т.е. аутологично перенесенными.

Аутологичная АКТ, как описано в настоящем документе, также может быть осуществлена путем (i) культивирования аутологических лимфоцитов для получения наращенных лимфоцитов; (ii) введения немиелоаблативной противолимфоидной химиотерапии млекопитающему и (iii) введения млекопитающему наращенных лимфоцитов после введения немиелоаблативной противолимфоидной химиотерапии. Аутологичные ПОЛ могут быть получены из стромы резецированных опухолей. Образцы опухолей получают из пациентов и готовят суспензии отдельных клеток. Суспензия отдельных клеток может быть получена любым подходящим способом, например, механически (деагрегация опухоли с использованием, например, диссоциатора gentleMACS (TM), Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния) или ферментативно (например, с помощью коллагеназы или ДНКазы).

Наращивание лимфоцитов, включая проникающих в опухоль лимфоцитов, таких как Т-клетки, может быть осуществлено с помощью любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть быстро наращены с помощью неспецифической стимуляции рецептора Т-клеток в присутствии питающих лимфоцитов и интерлейкина-2 (ИЛ-2), ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 или их комбинации. Неспецифические стимулы рецептора Т-клеток могут, например, включать воздействие ОКТ3 в количестве около 30 нг/мл, мышинным моноклональным антителом анти-CD3 (доступно от компании Ortho-McNeil(R), Raritan, N.J. или Miltenyi Biotec, Бергиш Гладбах, Германия). В альтернативном варианте Т-клетки могут быть быстро наращены при стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) *in vitro* одним или более антигенов (включая антигенные части, таких как эпитоп(ы), или раковая клетка, которые могут в некоторых случаях экспрессироваться из вектора, такого как пептид, связывающий человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), например MART-1, в количестве около 0,3 мкМ: 26-35 (27 L) или gp100:209-217 (210M)), в присутствии фактора роста Т-клеток, такого как ИЛ-2 или ИЛ-15 в количестве около 200-400 МЕ/мл, например 300 МЕ/мл; причем предпочтительным является ИЛ-2. Индуцированные *in vitro* Т-клетки быстро наращиваются при повторной стимуляции тем же антигеном (антигенами) рака, который генерирует стимул на HLA-A2-экспрессирующие антигенпредставляющие клетки. В альтернативном варианте Т-клетки могут быть повторно стимулированными воздействием облученных аутологических лимфоцитов или облученных HLA-A2 + аллогенных лимфоцитов и ИЛ-2, например.

В некоторых вариантах реализации изобретения немиелоаблативную лимфодеструктивную химиотерапию вводят млекопитающему перед введением млекопитающему наращенных лимфоцитов, проникающих в опухоль. Лимфодеструкция проводится с целью высвобождения места для вводимых лимфоцитов, в частности, за счет элиминации регуляторных Т-клеток и другие неспецифических Т-клеток, которые конкурируют за гомеостатические цитокины. Немиелоаблативная лимфодеструктивная химиотерапия может быть любой пригодной терапией, которая может вводиться любым пригодным способом, известным квалифицированному специалисту. Немиелоаблативная лимфодеструктивная химиотерапия может включать, например, введение циклофосфида и флударабина, особенно если рак представляет собой меланому, которая может быть метастатической. Предпочтительным путем введения циклофосфида и флударабина является внутривенный путь. Точно так же может быть введена любая пригодная доза циклофосфида и флударабина. В предпочтительном варианте около 40-80 мг/кг, например, около 60 мг/кг циклофосфида вводят в течение около двух дней, после чего около 15-35 мг/м<sup>2</sup>, например 25

мг/м<sup>2</sup>, флударабина вводят в течение около пяти дней, особенно если рак представляет собой меланому.

Специфическая опухолевая реактивность нарезанных ПОЛ может быть проанализирована любым способом, известным в данной области техники, например, путем измерения высвобождения цитокинов (например, интерферон-гамма) после совместного культивирования с опухолевыми клетками. В одном варианте реализации изобретения метод аутологичной АКТ включает обогащение культивированных ПОЛ для CD8 + Т-клеток перед быстрым наращиванием клеток. После культивирования ПОЛ в ИЛ-2, Т-клетки истощаются CD4+ клетками и обогащаются для CD8+ клеток с помощью, например, разделения микрогранул CD8 (например, с использованием системы CliniMACS<sup>plus</sup>CD8 microbead (Miltenyi Biotec)). В одном варианте реализации способа по изобретению фактор роста Т-клеток, который способствует росту и активации аутологичных Т-клеток, вводят млекопитающему либо одновременно с аутологичными Т-клетками, либо после аутологичных Т-клеток. Фактор роста Т-клеток может быть любым пригодным фактором роста, который способствует росту и активации аутологичных Т-клеток. Примеры пригодных факторов роста Т-клеток включают интерлейкин (ИЛ) -2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-12 и ИЛ-21, которые могут использоваться отдельно или в различных комбинациях, таких как ИЛ-2 и ИЛ-7, ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ7 и ИЛ-15, ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15, ИЛ-12 и ИЛ-7, ИЛ-12 и ИЛ-15 или ИЛ-12 и ИЛ2. ИЛ-12 является предпочтительным фактором роста Т-клеток.

В предпочтительном варианте реализации изобретения нарезанные лимфоциты, полученные этими способами, вводят с помощью внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится от около 30 до около 60 мин. Другие примеры путей введения включают внутривентральное, интратекальное и внутрелимфатическое введение. Точно так же может быть введена любая пригодная доза лимфоцитов. В одном варианте реализации изобретения вводят от около  $1 \times 10^{10}$  лимфоцитов до около  $15 \times 10^{10}$  лимфоцитов.

Раковой опухоли, которая лечится с помощью описанных композиций и способов, может быть любой рак, включая острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак кости, рак мозга, рак молочной железы, рак заднего прохода, анального канала или аноректальный рак, рак глаз, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря, или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак вульвы, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный рак, рак шейки матки, глиому, лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак яичников, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак мягких тканей, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря и рак желудочно-кишечного тракта, такой как, например, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак тонкого кишечника, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак полости рта, колоректальный рак и гепатобилиарный рак.

Рак может представлять собой рецидивирующий рак. В предпочтительном варианте реализации изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В предпочтительном варианте реализации изобретения рак представляет собой меланому, рак яичников, молочной железы и колоректальный рак, в еще более предпочтительном варианте реализации изобретения - меланому, в частности метастатическую меланому.

### Определения

Термин "субъект" относится к любому индивидууму, который является целью введения или лечения. Субъект может быть позвоночным, например, млекопитающим. Таким образом, субъект может быть пациентом-человеком или пациентом-животным. Термин "пациент" относится к субъекту, подлежащему лечению клиницистом, например, врачом.

Термин "терапевтически эффективное" относится к количеству композиции, используемой в количестве, достаточном для ослабления одной или более причин или симптомов заболевания или нарушения. Такое ослабление требует только снижения или изменения, но не обязательно устранения.

Термин "лечение" относится к медицинской тактике относительно пациента с целью вылечить, ослабить, стабилизировать или предотвратить заболевание, патологическое состояние или нарушение. Этот термин включает активное лечение, т.е. лечение, конкретно направленное на облегчение заболевания, патологического состояния или нарушения, а также включает этиологическое лечение, т.е. лечение, направленное на удаление причины, ассоциированной из заболеванием, патологическим состоянием или нарушением. Кроме того, этот термин включает паллиативное лечение, т.е. лечение, разработанное для облегчения симптомов и не направленное на излечение от заболевания, патологического состояния или нарушения; превентивное лечение, т.е. лечение, направленное на минимизацию, или частичное или полное приостановление развития ассоциированного заболевания, патологического состояния или нарушения; поддерживающее лечение, т.е. лечение, в котором используются дополнительная другая специфическая терапия, направленная на облегчение ассоциированного заболевания, патологического состояния или нарушения.

Термины "пептид", "белок" и "полипептид" используются в настоящем документе взаимозаменяемо

и обозначают природную или синтетическую молекулу, содержащую две или более аминокислоты, соединенных с помощью карбоксильной группы одной аминокислоты с альфа-аминой группой другой аминокислоты.

В данном контексте термин "пептидомиметик" означает миметик пептида, который содержит некоторые изменения химической структуры нормального пептида. Как правило, пептидомиметики усиливают некоторые характеристики оригинального пептида, такие как увеличение стабильности, улучшение доставки, увеличение периода полужизни и т.д. Способы получения пептидомиметиков, основанные на известной полипептидной последовательности, описаны, например, в патентах США №№ 5631280; 5612895; и 5579250. Использование пептидомиметиков может предусматривать включение неаминокислотного остатка с неамидными связями в данном положении. В одном варианте реализации настоящего изобретения представлен пептидомиметик, причем соединение имеет связь, пептидный каркас или аминокислотный компонент, который заменен пригодным миметиком. Некоторые неограничивающие примеры неприродных аминокислот, которые могут быть пригодными аминокислотными миметиками, включают β-аланин, L-α-аминонафталиновую кислоту, L-γ-аминонафталиновую кислоту, L-α-аминоизомаляновую кислоту, L-ε-аминокапроновую кислоту, 7-аминогептановую кислоту, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, N-ε-Вос-N-α-CBZ-L-лизин, N-ε-Вос-N-α-Fмос-L-лизин, L-метионин сульфид, L-норлейцин, L-норвалин, N-α-Вос-N-δ-CBZ-L-орнитин, N-δ-Вос-N-α-CBZ-L-орнитин, Вос-p-нитро-L-фенилаланин, Вос-гидроксипролин и Вос-L-тиопролин.

Термин "пептоид" относится к классу пептидомиметиков, боковые цепи которых присоединены в пептидном каркасе к атому азота, а не к α-углеродному атому (как в аминокислотах).

Термин "проникающие в опухоль лимфоциты" или "ПОЛ" относится к белым кровяным клеткам, которые оставили кровяное русло и мигрировали в опухоль.

Термин "регрессия" не обязательно означает 100% или полную регрессию. Точнее, существуют различные степени регрессии, которые обычным специалистом в данной области техники будут определены относительно потенциальной пользы или терапевтического эффекта. Термин также включает задержку проявления заболевания, или симптома или его состояния.

В данном контексте термин "сшивание" или "углеводородное сшивание" относится к использованию углеводорода для стабилизации вторичной структуры синтетического пептида и пептидомиметика.

Описан ряд вариантов реализации настоящего изобретения. Тем не менее, следует понимать, что могут быть осуществлены различные модификации без отступления от сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, другие варианты реализации изобретения находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

### Примеры

Пример 1. Направленное действие TLR для оптимизации наращивания и активности ПОЛ.

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются рецепторами распознавания, которые распознают широкий спектр микробных молекул. Связывание лигандов TLR с TLR, экспрессированными на макрофагах и дендритных клетках (ДК), приводит к эффективной презентации антигена для активации Т-клеток и иммунитета хозяина. В среде опухоли, функция макрофагов и ДК ингибируется. Как обсуждалось в настоящем документе, это супрессивное состояние может быть устранено с помощью введения лигандов TLR (табл. 1). Экзогенные лиганды TLR, добавленные к культурам ПОЛ, могут улучшить функцию ДК и макрофагов, что приводит к росту наращивания ПОЛ и усилению опухолеспецифических иммунных реакций.

Таблица 1

Рецепторы и лиганды TLR		
Рецептор	Лиганд (ы)	Типы клеток
TLR 1	Рам3CSK4	моноциты/макрофаги подмножество дендритных клеток
TLR 2	Рам3CSK4	моноциты/макрофаги Миелоидные дендритные клетки
TLR 3	поли I:C	Дендритные клетки
TLR 4	Рибомунил	моноциты/макрофаги Миелоидные дендритные клетки
TLR 9	СрG ODN	моноциты/макрофаги Плазмацитоидные дендритные клетки

Для того чтобы определить, способны ли экзогенные лиганды TLR, добавленные к культурам ПОЛ, усилить наращивание ПОЛ и повысить опухолеспецифичность, свежие опухоли меланомы измельчали на фрагменты 1-2 мм<sup>2</sup> в среде с добавлением ИЛ-2 в количестве 6000 МЕ/мл. Двенадцать фрагментов культивировали отдельно в ИЛ-2. Дополнительные группы 12 фрагментов обрабатывали следующими лигандами TLR: TLR1/2 лиганд Рам3CSK4 (1 мкг/мл), TLR3 лиганд поли (I:C) (12.5 мкг/мл), TLR4 ли-

ганд Рибомунил, экстракт бактерий для клинического применения (1 мкг/мл), TLR9 лиганд CpG ODN2006 (10 мкг/мл). Культуральную среду заменяли свежей средой каждые 2-3 дня. При достижении конfluence ПОЛ разделяли в новые лунки. После 10, 20 и 30 дней культивирования регистрировали общее количество фрагментов опухоли в результате роста ПОЛ. Кроме того, собирали и подсчитывали клетки из каждого фрагмента. Количество клеток сравнивали между контрольной группой ИЛ-2 и группой, обработанной лигандом TLR. Отдельные пулы ПОЛ из каждого фрагмента совместно культивировали с аутологичными или HLA-соответствующими и несоответствующими клетками меланомы в течение 24 ч. Супернатанты культур собирали и измеряли ИФН-гамма с помощью стандартного метода ИФА. Цель этих экспериментов - определить, приводит ли добавление лигандов TLR к увеличению роста ПОЛ из фрагментов, усилению пролиферации ПОЛ и/или повышению опухолеспецифической активации ПОЛ.

Пример 2. Идентификация пептоидов для пролиферации и активации ПОЛ.

В дополнение к агонистам TLR, с помощью ПОЛ могут экспрессироваться и другие костимуляторные молекулы. Набор пептоидов может быть скринирован для выявления соединений, которые приводят к усилению пролиферации и активации ПОЛ. Набор пептоидов, содержащий около 200000 соединений, скринировали в формате, подобном 384-луночному. Клеточные линии ПОЛ помечали красными квантовыми точками и скринировали для идентификации набора попаданий, которые селективно связывали красные клетки. После идентификации нескольких связывающих пептоидов, при их наличии изучали пролиферацию ПОЛ. Пептоиды, которые приводят к пролиферации ПОЛ (стимулирующие пептоиды), дополнительно анализировали в функциональном анализе.

Влияние стимулирующих пептоидов на функцию Т-клеток анализировали с использованием человеческой Т-клеточной линии (AS1). Клетки AS1 активировали человеческие CD8+ Т-клетки, которые демонстрируют специфичность по отношению к клеточной линии меланомы 624, но не к HLA-соответствующей клеточной линии меланомы 888. Клетки AS1 культивировали в 6000 МЕ/мл ИЛ-2 в присутствии возрастающих доз стимулирующих пептоидов. Клетки подсчитывали на 3, 7, 10, 14 и 21 день с целью определения дозы стимулирующих пептоидов, которая приводит к усилению пролиферации клеток AS1. Для того, чтобы определить, приводит ли культивирование с стимулирующими пептоидами к повышению функции Т-клеток, измеряли уровень ИФН-гамма, цитокина, секретируемого активированными Т-клетками. Клетки AS1 обрабатывали оптимальной дозой стимулирующих пептоидных тел, как определено выше. Контроль включал отдельно клетки AS1 и клетки AS1, обработанные антителом анти-41BB. Через 7 дней клетки AS1 собирали и культивировали совместно с 624 клетками миеломы. В качестве отрицательного контроля клетки AS1 культивировали совместно с 888 клетками миеломы. Через 24 часа супернатанты собирали и измеряли продукцию ИФН-гамма с помощью ИФА. Сравнения проводили между AS1, взятыми отдельно, и AS1, обработанными стимулирующими пептоидами. Для дополнительного изучения эффективности стимулирующих пептоидов, Т-клетки собирали из опухолей 10 пациентов с метастатической меланомой, вовлеченных в продолжающиеся клинические исследования, одобренные комитетом по этике (IRB). Фрагменты опухоли культивировали в среде, содержащей 6000 МЕ/мл ИЛ-2, для генерации пулов Т-клеток, как было ранее описано (Pilon-Thomas S., et al. J Immunother., 2012, 35(8):615-20). Нерелевантные или стимулирующие пептоиды добавляли к 12 фрагментам на каждое условие. Фрагменты, обработанные изотипом IgG или антителом анти-41BB (10 мкг/мл), использовали в качестве контроля. Через 21 день собирали и подсчитывали Т-клетки. Для измерения активации Т-клетки культивировали совместно с аутологичными или HLA-соответствующими опухолевыми клетками. Т-клетки, взятые отдельно, и Т-клетки, совместно культивированные с HLA-несоответствующими опухолевыми клетками, были включены в качестве отрицательного контроля. Т-клетки, культивированные в присутствии CD3/CD28, были включены в качестве положительного контроля. Через 24 ч супернатанты собирали и измеряли продукцию ИФН-гамма с помощью ИФА. Кроме того, пролиферацию Т-клеток оценивали в дни 7, 14 и 21, чтобы определить, приводит ли совместное культивирование со стимулирующими пептоидами к усилению пролиферации проникающих в опухоль Т-клеток. Эти исследования определяют, усиливает ли обработка Т-клеток пептоидными телами анти-PD 1 пролиферацию и активацию противомеланомных Т-клеток.

Пример 3. Оценка активности ПОЛ в мышинной модели.

Основным недостатком исследований ПОЛ является невозможность оценить ПОЛ в модели *in vivo*. Для оценки эффективности ПОЛ разработана мышинная модель. Первичные меланомные опухоли пациентов имплантировали во фланг мышей NSG (мышь без В- и Т-клеток, приобретенные у Jackson Laboratories). При достижении опухоли 5 мм в диаметре, нарощенные ПОЛ в количестве  $1 \times 10^7$  переносили из соответствующих образцов пациентов. Анализировали рост опухоли и выживаемость. Используя эту модель, определяли, приводит ли рост ПОЛ в стандартных средах с ИЛ-2, с лигандами TLR или со стимулирующими пептоидами к лучшему отторжению опухоли *in vivo*.

Пример 4. Позиционное сканирование с использованием 69 различных замещений.

В некоторых вариантах реализации изобретения подготавливается молекулярный набор, отображающий смесь 69 соединений, определенных общей структурой на фиг. 4А и имеющих различные замещения (приведены в табл. 2) либо в положении R<sub>1</sub>, либо R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, когда все оставшиеся положения R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>

или  $R_1$  и  $R_3$  или положения  $R_2$  и  $R_3$  отображают каждую из возможных  $69 \times 69$  комбинаций. Это составляет  $69 \times 69 \times 3$ , т.е. 14283 различных точек. Это количество намного меньше, чем то, которое можно получить, осуществив все возможные комбинации  $69 \times 69 \times 69$ , т.е. 328509 точек, для которых нужно было бы 952,2 планшета по 345 точек на планшет. Принцип позиционного сканирования требует только 41,4 планшета.

В этом варианте реализации принципа позиционного сканирования только около  $1/69$  части чистого вещества отображается на одну точку. Когда экран обнаруживает попадание, оно вновь готово для проверки своей активности. При таком подходе достигается  $\sim 1,4\%$  конкретной последовательности, представленной на лунку, а путем сравнения с попаданиями от других планшетов, которые дискретно отображают боковые цепи, в каждой из трех боковых цепей можно определить предпочтительные боковые цепи.

Таблица 2

Примеры замещений в положениях $R_1$ , $R_2$ или $R_3$	
1	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_3$
2	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$
3	$H_2N-CH_2-CH(CH_3)_2$
4	$H_2N-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$
5	$H_2N-CH_2$ -ЦИКЛОПЕНТИЛ
6	$H_2N-CH_2-CH_2$ -ЦИКЛОПЕНТИЛ
7	$H_2N-CH_2$ -ЦИКЛОГЕКСИЛ
8	$H_2N-CH_2-CH_2$ -ЦИКЛОГЕКСИЛ

- 9  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -ФЕНИЛ
- 10  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -ФЕНИЛ
- 11  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -ФЕНИЛ
- 12  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(1-НАФТИЛ)
- 13  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(1-НАФТИЛ)
- 14  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(1-НАФТИЛ)
- 15  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(2-НАФТИЛ)
- 16  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(2-НАФТИЛ)
- 17  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(2-НАФТИЛ)
- 18  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 19  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 20  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 21  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 22  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 23  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 24  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(4-ХЛОРФЕНИЛ)
- 25  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-ХЛОРФЕНИЛ)
- 26  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-ХЛОРФЕНИЛ)
- 27  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(3-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 28  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 29  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-( ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 30  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(3-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 31  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 32  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-МЕТОКСИФЕНИЛ)
- 33  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(3-ХЛОРФЕНИЛ)
- 34  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-ХЛОРФЕНИЛ)
- 35  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-ХЛОРФЕНИЛ)
- 36  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCH}_3$
- 37  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCH}_3$
- 38  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 39  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 40  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -(3-ОКСЕТАН)
- 41  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(3-ОКСЕТАН)
- 42  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -4-ПИРАН
- 43  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -(4-ПИРАН)

- 44  $H_2N-CH_2-COOH$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 45  $H_2N-CH_2-CH_2-COOH$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 46  $H_2N-CH_2-ФЕНИЛ-4-COOH$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 47  $H_2N-CH_2-CH_2-ФЕНИЛ-4-COOH$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ТРЕТ-БУТИЛ)
- 48  $H_2N-CH_2-CO-NHCH_3$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ)
- 49  $H_2N-CH_2-CH_2-CO-NHCH_3$
- 50  $H_2N-CH_2-ФЕНИЛ-4-CO-NHCH_3$
- 51  $H_2N-CH_2-CH_2-ФЕНИЛ-4-CO-NHCH_3$
- 52  $H_2N-CH_2-CO-N(CH_3)_2$
- 53  $H_2N-CH_2-CH_2-CO-N(CH_3)_2$
- 54  $H_2N-CH_2-ФЕНИЛ-4-CO-N(CH_3)_2$
- 55  $H_2N-CH_2-CH_2-ФЕНИЛ-4-CO-N(CH_3)_2$
- 56  $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 57  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 58  $H_2N-CH_2-CH_2-NH-COCH_3$
- 59  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-NH-COCH_3$
- 60  $H_2N-CH_2-CH_2-МОРФОЛИН$
- 61  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-МОРФОЛИН$
- 62  $H_2N-CH_2-2-ИМИДАЗОЛ$  (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 63  $H_2N-CH_2-CH_2-2-ИМИДАЗОЛ$  (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 64  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-2-ИМИДАЗОЛ$  (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 65  $H_2N-CH_2-CH_2-N=C(NH_2)_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 66  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-N=C(NH_2)_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 67  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N=C(NH_2)_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 68  $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N=C(NH_2)_2$ (ЗАЩИЩЕННЫЙ ВОС)
- 69  $H_2N-CH_2-CH_2-(3-ИНДОЛИЛ)$

На фиг. 5 приведен пример планшета, используемого для позиционного сканирования. Если бы точки 1-69 имели идентичное  $R_1$  во всех точках, то каждая из отдельных и различных 69 боковых цепей в  $R_2$  и смесь всех 69 соединений отображались бы в положении  $R_3$ . Если бы точки 70-138 аналогично имели все положения  $R_1$ , отображающие боковую цепь 2, то каждая из 69 различных боковых цепей в положении  $R_2$  и смесь 69 различных боковых цепей отображались бы в положении  $R_3$  и так далее, чтобы перекрыть все возможные комбинации. Если бы конкретные планшеты  $R_2$  имели смесь 69 соединений, отображаемых в положении  $R_1$ , тогда для всех 69 точек с  $R_2$ , имеющих ту же боковую цепь, эквивалентную соединению 1 и для каждого отдельного соединения из 69 соединений для положения  $R_3$ , аналогичного конкретным планшетам  $R_1$ , описанным выше, и для остальных комбинаций положение  $R_1$ , отображало бы каждое из 69 соединений, а положение  $R_2$  отображало бы смесь из 69 соединений, а точки 1-69 имели бы ту же боковую цепь в положении  $R_3$ .

Пример результатов позиционного скрининга также приведен на фиг. 5. Первая затушеванная точка имеет лучшие боковые цепи  $R_1$  с боковой цепью, эквивалентной соединению 2, и  $R_2$ , эквивалентной соединению 26, и по меньшей мере одно из возможных 69 соединений в положении  $R_3$ . Следующая точка показывает, что соединение 3 является активным в  $R_1$ , а  $R_2$  имеет соединение 10 и по меньшей мере одно из 69 соединений в положении  $R_3$ . Последняя точка на планшете показывает, что  $R_1$  эквивалентно соединению 5 и соединению 55 для  $R_2$  и по меньшей мере одному из 69 соединений в положении  $R_3$ . Анализируя аналогичные результаты скрининга из определенного положения планшетов  $R_2$  и  $R_3$ , можно определить точную последовательность.

Для получения вторичных аминов в реакции  $SN_2$  необходимо 69 соединений с аналогичной реакционной способностью. Возможна огромная структурная изменчивость, но все же некоторые возможные боковые цепи приведены в табл. 2.

Пример 5. Способы сшивания для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки".

Существуют несколько эффективных способов сшивания, которые могут быть использованы для стабилизации циклического пептоидно-пептидного гибридного каркаса по типу бета-"шпильки". Сшивание двух пептоидных боковых цепей является самым простым для осуществления способом относительно синтеза и будет предварительно организовывать эти две пептоидные боковые цепи в непосредственной близости друг к другу, причем эта близость усиливает конформации общего каркаса, которые совместимы с желаемой циклической вторичной структурой по типу бета-"шпильки". Самыми простыми для сшивания парами являются пропаргиламины в пептоидных боковых цепях, которые необходимо скрепить и создать условия для реакции с двумя терминальными алкинами с бифункциональным диазидом с помощью стабильного органического линкера, который охватывает расстояние между этими пептоидными боковыми цепями. Для органического линкера необходимо 3 и более атомов, чтобы охватить

это расстояние. На фиг. 6 показана мета-ксиленоловая группа; тем не менее, может использоваться любая стабильная комбинация атомов. Кроме того, цепь не должна быть просто линкером, поскольку группа также может использоваться, например, для оптимизации фармакокинетических свойств.

В альтернативном варианте тот же или иной линкер может использоваться для сшивания пропаргиловых боковых цепей, которые находятся на более проксимальных пептоидных боковых цепях, как показано на фиг. 7. Как описано в настоящем описании, боковая цепь из аминокислотной и проксимальной пептоидной боковой цепи также возможна, но не продемонстрирована. Более общая схема, в которой используется амид и алкин, приведена на фиг. 8. Также может использоваться реакция RCM (реакция обмена метатезиса с замыканием цикла), как показано на общем примере на фиг. 9.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понятны специалистам в данной области техники, к которой относится описанное изобретение. Цитируемые публикации и материалы, по которым они цитируются, специально включены в документ посредством ссылки.

Специалистам в данной области техники будет понятно, или они смогут с использованием не более чем рутинных экспериментов определить множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ наращивания проникающих в опухоль лимфоцитов *ex vivo* для применения их при адоптивной клеточной терапии (АКТ) у субъекта, страдающего от рака, включающий культивирование лимфоцитов с целью получения наросших лимфоцитов в культуральной среде, содержащей агонист толл-подобного рецептора (TLR) в количестве, эффективном для усиления опухолеспецифичности наросших лимфоцитов.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что агонист TLR является лигандом для TLR, выбранным из группы, состоящей из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 и TLR9.

3. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что агонист TLR содержит лиганд, выбранный из группы, состоящей из Pam3CSK4, поли I:C, рибомунилы и CpG-ODN.

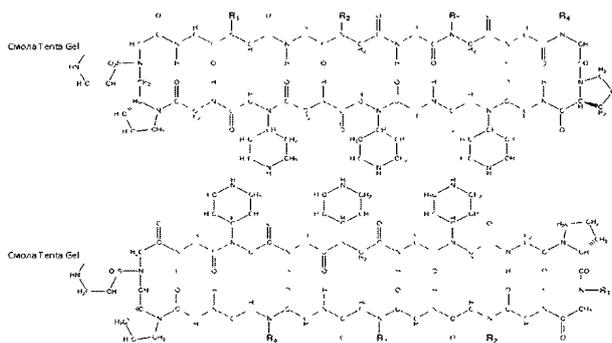
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что рак представляет собой солидную опухоль.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака молочной железы и колоректального рака.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что рак является метастатическим.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что рак является рецидивирующим.

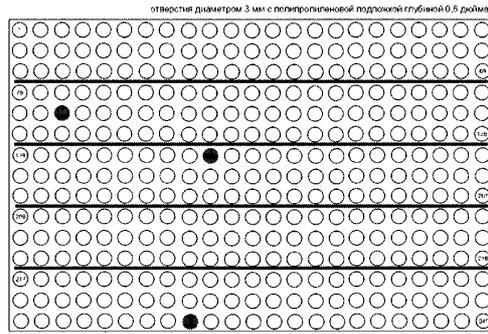
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что субъект является человеком.



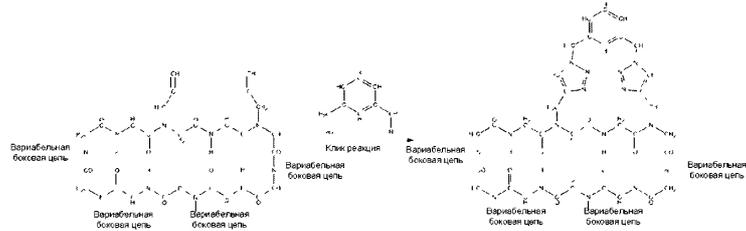
Фиг. 1А



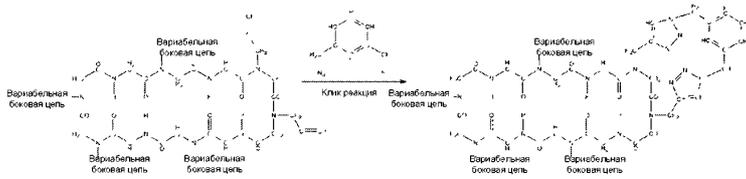




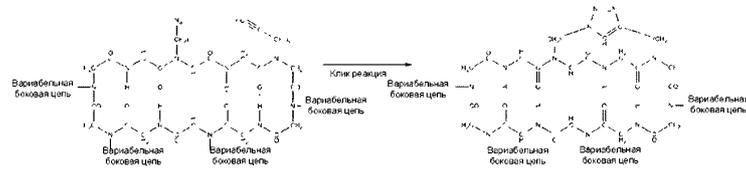
Фиг. 5



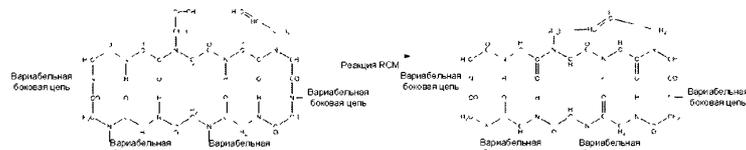
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

