

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202100145** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.02.02**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.10.23**

(51) Int. Cl. *A61K 31/155* (2006.01)  
*A61K 45/00* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)  
*A61P 31/10* (2006.01)  
*A61P 31/02* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ГУАНАБЕНЗА**

---

(31) **18202122.0**

(32) **2018.10.23**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/078867**

(87) **WO 2020/083982 2020.04.30**

(71) Заявитель:

**УНИВЕРСИТЕ КАТОЛИК ДЕ  
ЛУВЕН (BE)**

(72) Изобретатель:

**Ван Ден Эйнде Бено, Зу Цзинцин  
(BE)**

(74) Представитель:

**Баландина Л.А. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к использованию гуанабеназа совместно с иммунотерапией в лечении онкологических или инфекционных заболеваний. В частности, гуанабенз используется в качестве адъюванта для иммунотерапии, например иммунотерапии онкологических заболеваний, или вакцинации. Настоящее изобретение относится, более конкретно, к использованию гуанабеназа совместно с адоптивной клеточной терапией, терапевтической вакцинацией, терапией ингибиторами контрольных точек иммунного ответа или терапией агонистами Т-клеток в лечении онкологических заболеваний. Настоящее изобретение также относится к использованию гуанабеназа совместно с вакцинацией в ходе профилактического и/или терапевтического лечения инфекционных заболеваний.

---

**A1**

**202100145**

**202100145**

**A1**

## **ПРИМЕНЕНИЕ ГУАНАБЕНЗА**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии, в частности, к области иммунотерапии онкологических заболеваний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в качестве адъюванта для иммунотерапии.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Иммунотерапию можно в широком понимании определить как терапию, направленную на индукцию и/или усиление иммунного ответа в отношении конкретной цели, например, в отношении возбудителей инфекционных заболеваний, таких как вирусы, бактерии, грибки или простейшие паразиты, или в отношении раковых клеток. В целях улучшения терапевтического эффекта препараты для иммунотерапии часто применяются в сочетании с адъювантом. Таким образом, адъюванты предназначены для усиления или модуляции иммунного ответа, направленного на определенную цель, в частности, путем увеличения силы, ускорения и/или пролонгации действия упомянутого иммунного ответа.

В последние годы иммунотерапия зарекомендовала себя в качестве одной из самых многообещающих разработок в лечении онкологических заболеваний. Противораковая иммунотерапия управляет деятельностью иммунной системы субъекта с тем, чтобы усилить иммунную реакцию, направленную против раковых клеток, и, следовательно, вызвать их целенаправленное уничтожение.

В настоящее время иммунотерапия в составе терапии онкологических заболеваний может принимать различные формы, включая, например, адоптивный перенос клеток, в особенности, цитотоксических клеток, введение ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, введение агонистов Т-клеток, введение моноклональных антител или введение цитокинов (Ribas & Wolchok, 2018 год, Science 359, 1350-1355; Galluzziet и другие авторы, 2014 год, Oncotarget 5, 12472-12508; Sharma & Allison, 2015 год, Science 348, 56-61).

Иммунотерапия в лечении онкологических заболеваний включает также терапевтические вакцины и применение БЦЖ (бациллы Кальмена – Герена), последние используются в лечении онкологических заболеваний мочевого пузыря (Ribas & Wolchok, 2018 год, *Science* 359, 1350-1355; Garget *и другие авторы*, 2017 год, *Trends Immunol* 38, 577-593; Durgeau *и другие авторы*, 2018 год, *Front Immunol* 9, 14).

Одной из центральных идей, лежащих в основе иммунотерапии онкологических заболеваний, является присутствие антигенов, которые в большом количестве или селективно экспрессируются или мутируют в раковых клетках, обеспечивая, таким образом, возможность специфического распознавания и последующего разрушения раковых клеток (Wirth & Kuhnle, 2017 год, *Front Immunol* 8, 1848; Hugo *и другие авторы*, 2016 год, *Cell* 165, 35-44, Coulie *и другие авторы*, 2014 год, *Nature Reviews Cancer* 14, 135–146). Еще одна основополагающая идея иммунотерапии онкологических заболеваний состоит в присутствии в опухолевых образованиях иммунных клеток, в частности, лимфоцитов (Tumeh *и другие авторы*, 2014 год, *Nature* 515, 568-571). Подобные лимфоциты, которые принято называть инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (ИОЛ, англ. TIL), в значительной степени состоят из эффекторных TIL, которые могут целенаправленно идентифицировать и убивать опухолевые клетки посредством распознавания вышеуказанных опухолеспецифичных антигенов (Durgeau *и другие авторы*, 2018 год, *Front Immunol* 9, 14; Tumeh *и другие авторы*, 2014 год, *Nature* 515, 568-571).

Тем не менее, в зависимости от типа онкологического заболевания и от индивидуальной ответной реакции, опухоли инфильтрируются иммунными клетками, в частности, лимфоцитами, в различной степени. Опухоли, в которых лимфоциты присутствуют в больших количествах, принято называть «горячими», а опухоли с небольшим количеством лимфоцитов принято называть «холодными» опухолями (Sharma & Allison, 2015 год, *Science* 348, 56-61).

Известно, что повышенная инфильтрация опухолей эффекторными Т-клетками, а, следовательно, усиленный Т-клеточный ответ, направленный против опухолевых клеток, коррелирует с повышенной выживаемостью для многих различных видов рака. Таким образом, ряд методов иммунотерапии онкологических заболеваний имеет целью облегчить проникновение эффекторных Т-клеток в опухоль и/ или повысить их активность в опухолях.

Один из подобных методов иммунотерапии состоит в переносе, *то есть*, инфузии субъекту воздействующих на опухоль иммунных клеток, например, инфильтрирующих опухоль Т-клеток. Такой перенос, называемый адоптивным переносом клеток, был впервые описан в 1988 году (Rosenberg *и другие авторы*, 1988 год, N Engl J Med 319, 1676-1680). Другой подобный метод иммунотерапии заключается во введении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа блокируют взаимодействие ингибирующих рецепторов, экспрессируемых на Т-клетках, с их лигандами. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа вводятся, чтобы предотвратить ингибирование Т-клеток факторами, экспрессируемыми опухолевыми клетками, и, таким образом, усилить Т-клеточный ответ, направленный против упомянутых опухолевых клеток (Marin Acevedo *и другие авторы*, 2018 год, J Hematol Oncol 11, 39).

Однако общая эффективность иммунотерапии у большинства пациентов остается ограниченной (Jenkins *и другие авторы*, 2018 год, Br J Cancer 118, 9-16; Ladanyi. 2015 год, Pigment Cell Меланому Res 28, 490-500). Одним из критически важных вопросов является количество опухолеспецифичных Т-клеток в опухоли и истощение указанных инфильтрирующих опухоль Т-клеток, характеризующееся слабой эффекторной функцией, устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов и/ или транскрипционным состоянием, отличным от такового у функциональных эффекторов или Т-клеток памяти (Jochems & Schlom, 2011 год, Exp Biol Med (Maywood) 236, 567-579).

Таким образом, существует потребность в более эффективных методах

иммунотерапии, в частности, иммунотерапии онкологических заболеваний. В частности, все еще существует потребность в адьювантах, которые вводятся совместно с иммунотерапией, в частности, совместно с иммунотерапией онкологических заболеваний, для усиления эффекта иммунотерапии, в частности, путем усиления клеточного иммунного ответа, направленного против раковых клеток, например, посредством повышения уровня инфильтрации опухоли Т-клетками, повышения выживаемости онкоспецифических Т-клеток и/или усиления эффекторной функции онкоспецифических Т-клеток.

Гуанабенз представляет собой небольшую молекулу, известную, в частности, как агонист альфа2-адренорецепторов. Как следствие, гуанабенз (Wytensin®) прописывали в качестве гипотензивного средства для перорального введения. Осуществляя поиск соединений, способных усиливать противораковый иммунный ответ, Заявитель с удивлением обнаружил, что гуанабенз способен стимулировать иммунный ответ, в частности, клеточный иммунный ответ, например, Т-клеточный иммунный ответ. Например, Заявитель с удивлением обнаружил, что гуанабенз значительно повышает эффективность противораковой иммунотерапии путем стимулирования функциональной активности противоопухолевых Т-клеток и увеличения их способности уничтожать раковые клетки *in vivo*. Заявитель также продемонстрировал, что гуанабенз усиливает действие вакцинации. Действительно, Заявитель с удивлением обнаружил, что введение гуанабенза с вакциной на основе антигена значительно усиливает специфический клеточный иммунный ответ, индуцированный повторным воздействием такого антигена.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к использованию гуанабенза в качестве адьюванта для целей иммунотерапии. В частности, настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией для лечения онкологических или инфекционных заболеваний. Как наглядно показано далее в настоящем документе, гуанабенз действует как

адьювант для иммунотерапии, в частности, иммунотерапии онкологических заболеваний. В частности, настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с адоптивной клеточной терапией, терапией иммунными клетками с химерными рецепторами антигена (CAR), терапией ингибиторами контрольных точек, терапией агонистами Т-клеток, терапевтической вакцинацией, терапией антителами (например, моноклональными антителами и/ или биспецифическими антителами), онколитической вирусной терапией или цитокиновой терапией в лечении онкологических заболеваний. Настоящее изобретение также относится к использованию гуанабенза совместно с вакцинацией в ходе профилактики и/ или терапии инфекционных заболеваний.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении онкологических заболеваний или инфекционных заболеваний у нуждающихся в этом субъектов. В одном варианте осуществления гуанабенз используется в качестве адьюванта для иммунотерапии. В одном варианте осуществления гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии. В одном варианте осуществления гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии, при этом под режимом кондиционирования понимается терапия, предназначенная для подготовки субъекта к проведению иммунотерапии.

В одном варианте осуществления гуанабенз используется совместно с иммунотерапией в лечении онкологического заболевания, выбранного из группы, содержащей или включающей острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, карциному надпочечника, рак желчного протока, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, гастроинтестинальные стромальные опухоли, глиобластому, раковые образования головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, лимфому Ходжкина, рак почки, рак легких,

меланому, рак кожи из клеток Меркеля, мезотелиому, множественную миелому, миелопролиферативные нарушения, неходжкинскую лимфому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак слюнной железы, саркому, плоскоклеточную карциному, рак яичек, рак щитовидной железы, уротелиальную карциному и увеальную меланому. В одном варианте осуществления гуанабенз используется совместно с иммунотерапией в лечении онкологического заболевания, выбранного из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, адренокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы.

В одном варианте осуществления гуанабенз используется совместно с иммунотерапией в лечении инфекционного заболевания, вызванного вирусом, бактерией, грибом или простейшим паразитом.

В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии и/ или одновременно с иммунотерапией.

В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,01 мг на килограмм массы тела (мг/кг) до приблизительно 15 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления, иммунотерапия включает в себя адоптивный перенос иммунных клеток. В одном варианте осуществления упомянутые иммунные клетки представляют собой Т-клетки или естественные клетки-киллеры (NK-клетки). В одном варианте осуществления упомянутые иммунные клетки представляют собой CAR Т-клетки или CAR NK-клетки. В одном варианте осуществления упомянутые иммунные клетки представляют собой аутологичные иммунные клетки. В одном варианте осуществления упомянутые иммунные клетки представляют собой CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

Согласно одному варианту осуществления, иммунотерапия включает

ингибиторы контрольных точек иммунного ответа. В одном варианте осуществления упомянутый ингибитор контрольных точек выбирается из группы, содержащей или включающей ингибиторы PD-1, например, пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181 и JNJ-63723283, ингибиторы PD-L1, например, авелумаб, атезолизумаб и дурвалумаб, ингибиторы CTLA-4, например, ипилимумаб и тремелимумаб, и любые сочетания таковых.

Согласно одному варианту осуществления, иммунотерапия включает в себя вакцинацию.

### **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

В настоящем изобретении следующие термины имеют следующие значения:

- **“Приблизительно”**, предшествующий цифре, означает плюс или минус 10% или менее от величины упомянутой цифры. Следует понимать, что величина, к которой относится термин «приблизительно», также конкретным образом - и по возможности - указывается.

- **“Адьювант”** в контексте настоящего изобретения означает соединение или комбинацию соединений, усиливающих действие иммунотерапии. В одном варианте осуществления адьювант используется совместно с иммунотерапией в лечении онкологических заболеваний и, таким образом, усиливает иммунный ответ, направленный против раковых клеток. Например, адьювант может увеличивать количество лимфоцитов, в частности, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов; способствовать активации лимфоцитов, в частности, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов; повышать приспособленность лимфоцитов, в частности, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов; и/или повышать выживаемость лимфоцитов, в частности, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. В одном варианте осуществления адьювант используется совместно с иммунотерапией в лечении инфекционных заболеваний и, таким образом, усиливает иммунный ответ, направленный против возбудителя

инфекции. Например, адъювант может увеличивать количество лимфоцитов, в частности, эффекторных лимфоцитов; способствовать активации лимфоцитов, в частности, эффекторных лимфоцитов; повышать приспособленность лимфоцитов, в частности, эффекторных лимфоцитов; и/ или повышать выживаемость лимфоцитов, в частности, эффекторных лимфоцитов.

- **“Аллогенный”** означает любой материал, взятый или полученный от другого представителя того же биологического вида, то есть, представителя, отличного от того, которому вводится данный материал. Два или более представителей считаются аллогенными по отношению друг к другу, если гены в одном или более локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенные материалы [взятые] от представителей одного биологического вида могут иметь достаточные генетические различия, чтобы взаимодействовать антигенно.

- **“Аутологичный”** означает любой материал, взятый или полученный от того же субъекта, которому он позднее будет повторно введен.

- **“Противораковая иммунотерапия”** означает иммунотерапию, применяемую для лечения онкологического заболевания, при этом указанная иммунотерапия модулирует иммунный ответ субъекта с целью индуцировать и/ или стимулировать иммунный ответ субъекта, направленный против раковых клеток. В одном варианте осуществления иммунотерапия онкологических заболеваний включает в себя или представляет собой адоптивный перенос иммунных клеток, в частности, Т-клеток (например, альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клеток или гамма дельта Т-клеток), НК-клеток или НКТ-клеток. В одном варианте осуществления иммунотерапия онкологических заболеваний включает в себя или представляет собой введение ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В одном варианте осуществления иммунотерапия онкологических заболеваний включает в себя или представляет собой введение агониста иммунных контрольных точек. В одном варианте осуществления иммунотерапия онкологических заболеваний включает в себя или представляет

собой введение антител. В одном варианте осуществления иммунотерапия онкологических заболеваний включает в себя или представляет собой введение терапевтической противораковой вакцины.

- **“Режим кондиционирования”** означает соединение или терапию, применяемые для подготовки субъекта к проведению последующей терапии, используемой в лечении таких заболеваний, как рак. Например, режим кондиционирования может применяться перед адоптивным переносом иммунных клеток.

- **“Терапия первой линии”**, также известная как **“первичная терапия”** или **“индукционная терапия”**, означает терапию, применяемую первой для лечения заболевания, например, онкологического заболевания. Терапия первой линии может быть дополнена или заменена другой терапией.

- **“Иммунотерапия”** означает терапию, направленную на индукцию и/или усиление иммунного ответа в отношении конкретной цели, например, в отношении возбудителей инфекционных заболеваний, таких как вирусы, бактерии, грибки или простейшие паразиты, или в отношении раковых клеток. В контексте настоящего изобретения к примерам иммунотерапии относятся, помимо прочего, вакцинация, например, профилактическая и терапевтическая вакцинация; адоптивный перенос иммунных клеток, в частности, Т-клеток (например, альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клеток или гамма дельта Т-клеток) или НК-клеток; ингибиторы контрольных точек; агонисты контрольных точек; антитела.

- **“Инфекционное заболевание”** означает заболевание, вызываемое возбудителем инфекции, таким как вирус, бактерия, грибок (например, дрожжевые грибки), водоросль или простейший паразит (например, амеба).

- **“Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество”** или **“фармацевтически приемлемый носитель”** означает вспомогательное вещество или носитель, широко известные в данной области техники, включая, в частности, любые растворители, дисперсионные среды, покрытия,

антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты и вещества, замедляющие абсорбцию. Таким образом, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или фармацевтически приемлемый носитель означает нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательный состав любого рода. Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты согласно требованиям таких регулятивных органов, как FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) или ЕМА (Европейское агентство лекарственных средств).

- **“Фармацевтически приемлемая соль”** означает соли свободной кислоты или свободного основания, которые не относятся к биологически неприемлемым и которые получают, в основном, путем реакции свободного основания с соответствующей органической или неорганической кислотой или путем реакции свободной кислоты с соответствующим органическим или неорганическим основанием. Подходящие соли присоединения кислоты получают из кислот, образующих нетоксичные соли. Примеры включают ацетат, адипат, аспартат, бензоат, безилат, бикарбонат/ карбонат, бисульфат/ сульфат, борат, камсилат, цитрат, цикламат, эдисилат, эзилат, формиат, fumarat, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/ хлорид, гидробромид/ бромид, гидроиодид/ иодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафтилат, 2-напсилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/ гидроген, фосфат/ дигидроген, фосфат, пироглутамат, сахарат, стеарат, сукцинат, таннат, тартрат, тозилат, трифторацетат и ксинафоат. Подходящие соли присоединения основания получают из оснований, образующих нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглюмина, оламина, калия, натрия, трометамина, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламина, морфолина,

4-(2-гидроксиэтил)морфолина и цинка. Также могут образовываться полусоли кислот и оснований, *например*, гемисульфаты и полусоли кальция.

- “Субъект” означает млекопитающее, предпочтительно человека. В одном варианте осуществления у субъекта диагностировано онкологическое или инфекционное заболевание. В одном варианте осуществления субъектом является пациент, предпочтительно человек, который ожидает получения или получает медицинскую помощь, или в отношении которого проводилась/проводится/будет проводиться медицинская процедура или осуществляется контроль развития или течения заболевания, например, онкологического или инфекционного заболевания. В одном варианте осуществления субъектом является пациент–человек, в отношении которого осуществляется лечение и/или контроль развития или течения онкологического или инфекционного заболевания. В одном варианте осуществления субъект является существом мужского пола. В другом варианте осуществления субъект является существом женского пола. В одном варианте осуществления субъект взрослый. В другом варианте осуществления субъект ребенок. В одном варианте осуществления субъект устойчив к иммунотерапии. В одном варианте осуществления субъект устойчив к иммунотерапии онкологических заболеваний.

- “Т-клеточный иммунный ответ” означает иммунный ответ, опосредованный Т-клетками. В одном варианте осуществления термин «Т-клеточный иммунный ответ», используемый в контексте настоящего документа, означает ответную реакцию, опосредованную эффекторными Т-клетками, предпочтительно ответную реакцию, опосредованную цитотоксическими Т-клетками. В контексте настоящего документа термин «Т-клеточный иммунный ответ» включает иммунный ответ, опосредованный альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клетками и иммунный ответ, опосредованный гамма дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетками.

- “Терапевтически эффективное количество” или “терапевтически эффективная доза” означает количество или дозу гуанабенза, направленные на

то, чтобы, не вызывая существенных негативных или нежелательных побочных эффектов у субъекта, (1) отсрочить или предотвратить наступление у субъекта патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания; (2) уменьшить тяжесть или распространение патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания; (3) замедлить или остановить прогрессирование, обострение или усугубление одного или более симптомов патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания, поразившего субъекта; (4) улучшить симптоматику патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания, поразившего субъекта; или (5) осуществить лечение патологического состояния или заболевания, поразившего субъекта, в частности, онкологического или инфекционного заболевания, поразившего субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть введено до наступления патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания, в профилактических или превентивных целях. В другом варианте, или дополнительно, терапевтически эффективное количество может быть введено после наступления патологического состояния или заболевания, в частности, онкологического или инфекционного заболевания, для обеспечения терапевтического действия.

- “**Лечение**” означает терапевтическое лечение, или профилактические или превентивные меры, или и то, и другое, где задача состоит в предотвращении, замедлении (облегчении) или устранении конкретного патологического состояния или заболевания, *например*, онкологического или инфекционного заболевания. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, “лечение” означает терапевтическое лечение. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, “лечение” означает профилактическое или превентивное лечение. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения, “лечение” означает как профилактическое (или превентивное)

лечение, так и терапевтическое лечение. К числу лиц, нуждающихся в лечении, относятся лица, уже страдающие от патологического состояния или заболевания, *например*, онкологического или инфекционного заболевания, а также лица, предрасположенные к развитию патологического состояния или заболевания, *например*, онкологического или инфекционного заболевания, или лица, у которых следует предотвратить наступление патологического состояния или заболевания, *например*, онкологического или инфекционного заболевания. В одном варианте осуществления субъект, страдающий от онкологического или инфекционного заболевания, успешно "прошел лечение", если после получения терапевтически эффективного количества гуанабенза, в частности, терапевтически эффективного количества гуанабенза в сочетании с иммунотерапией, субъект демонстрирует поддающееся наблюдению и/или измерению уменьшение числа раковых клеток или переносчиков инфекционного заболевания; уменьшение процентной доли общего числа злокачественных или инфицированных клеток; купирование, в определенной степени, одного или более симптомов, связанных с онкологическим или инфекционным заболеванием; снижение заболеваемости и смертности, то есть, снижение риска возникновения заболевания и/или смерти, связанных с онкологическим или инфекционным заболеванием, и/или повышение качества жизни. Вышеуказанные параметры для оценки успешности лечения и положительной динамики заболевания легко поддаются измерению посредством стандартных процедур, хорошо известных врачу.

- **“Инфильтрирующие опухоль лимфоциты”** или **“TIL”** означают Т-клетки, присутствующие в опухоли, либо до иммунотерапии, либо после иммунотерапии, например, после адоптивного переноса клеток или терапевтической вакцинации. В контексте настоящего изобретения Т-клетки включают альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клетки и гамма дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетки. В контексте настоящего изобретения Т-клетки включают  $CD4^+$  Т-клетки и  $CD8^+$  Т-клетки. В контексте настоящего изобретения Т-клетки также включают регуляторные Т-

клетки (Treg), например, клетки CD4<sup>+</sup>Treg или CD8<sup>+</sup>Treg, и эффекторные Т-клетки, например, эффекторные Т-клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. В частности, эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки включают цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки. В одном варианте осуществления, эффекторные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, или эффекторные ТЛ, представляют собой эффекторные CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетки, присутствующие в опухоли, либо перед иммунотерапией, либо после иммунотерапии, например, адоптивного переноса клеток или терапевтической вакцинации. В одном варианте осуществления, регуляторные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, или регуляторные ТЛ, представляют собой клетки CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>Treg, присутствующие в опухоли, либо перед иммунотерапией, либо после иммунотерапии, например, адоптивного переноса клеток или терапевтической вакцинации.

- **“Опухолеспецифический антиген”** или **“опухолеассоциированный антиген”** означает антиген, специфично и/ или в больших количествах экспрессируемый раковыми клетками или опухолевыми клетками. Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточные рецепторы, распознающие и связывающие упомянутые антигены, могут именоваться Т-клетками, распознающими опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген, Т-клетками, специфическими к опухолеспецифическому или опухолеассоциированному антигену, Т-клетками, специфическими в отношении опухолеспецифического или опухолеассоциированного антигена, или Т-клетками, направленными на опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген.

- **“Вакцинация”** означает использование препарата, в состав которого входит вещество или группа веществ (*то есть*, вакцины), предназначенного для индукции и/ или усиления у субъекта направленного иммунного ответа в отношении возбудителя инфекционного заболевания (например, вирусов, бактерий, грибков или простейших паразитов) или в отношении раковых клеток. Профилактическая вакцинация применяется для того, чтобы определенное заболевание у субъекта не развивалось или ограничивалось

легкой формой. Например, в составе профилактических вакцин может содержаться переносчик конкретного инфекционного заболевания (мертвый, инактивированный, или ослабленный, но живой), или его компонент(ы) (например, молекула (молекулы), расположенные на поверхности переносчика инфекционного заболевания, или токсин(ы), выделяемые переносчиком инфекционного заболевания), либо выделенные из переносчика инфекционного заболевания, либо полученные методами генной инженерии. Терапевтическая вакцинация предназначена для лечения у субъекта конкретного заболевания, например, онкологического или инфекционного заболевания, такого как герпес или гепатит В. Так, терапевтические противораковые вакцины могут содержать опухолеассоциированный антиген или опухолеассоциированные антигены, с целью индукции и/или усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа, в частности, Т-клеточного иммунного ответа, направленного против раковых клеток, экспрессирующих указанный опухолеассоциированный антиген (антигены).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении заболеваний или патологических состояний, при которых требуется модуляция иммунного ответа.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении иммунологических нарушений у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении иммунологических нарушений у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый гуанабенз применяется в качестве иммуномодулирующего средства.

В контексте настоящего документа понятие «иммунологические нарушения» относится к заболеваниям или патологическим состояниям, возникающим в результате нарушения функции иммунной системы. Примеры

иммунологических нарушений включают, помимо прочего, иммунодефицитные состояния, аутоиммунные заболевания, аллергические состояния, воспалительные заболевания, астму и реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

В частности, настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении заболеваний или патологических состояний, при которых требуется усиление иммунного ответа.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении иммунодефицитных состояний у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении иммунодефицитных состояний у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый гуанабенз используется для усиления иммунного ответа.

Примеры иммунодефицитных состояний включают, в числе прочих, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) и первичные иммунодефицитные состояния (PI или PID), также называемые первичными иммунодефицитами (ПИД), включая X-сцепленную агаммаглобулинемию (XLA) и аутосомно-рецессивную агаммаглобулинемию (ARA), атаксию-телеангиэктазию, хронические гранулематозные заболевания и другие нарушения функции фагоцитарных клеток, переменный неклассифицируемый иммунодефицит, дефицит комплемента, синдром Ди Джорджи, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), гипер-IgE-синдром, гипер-IgM-синдромы, дефицит подкласса IgG, врожденные дефекты иммунной системы, синдром дефицита эссенциального модулятора ядерного фактора каппа-B (NEMO), селективный дефицит IgA, селективный дефицит IgM, тяжелый комбинированный иммунодефицит и комбинированный иммунодефицит, дефицит специфических антител, транзиторную младенческую гипогаммаглобулинемию, WHIM-синдром (бородавки,

гипогаммаглобулинемия, инфекции и миелокатексис), синдром Вискотта-Олдрича.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый гуанабенз используется для усиления иммунного ответа в отношении раковых клеток или в отношении возбудителя инфекции, соответственно. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении онкологического заболевания, где гуанабенз подлежит введению в качестве терапии второй линии после проведения иммунотерапии в качестве терапии первой линии. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в лечении онкологического заболевания, где гуанабенз подлежит введению в качестве последующей терапии после ранее проведенной иммунотерапии.

Настоящее изобретение также относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый гуанабенз используется в качестве адъюванта для иммунотерапии. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии.

Настоящее изобретение также относится к адъюванту для иммунотерапии, применяемой в лечении онкологического или инфекционного заболевания, включающему или содержащему гуанабенз. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к адъюванту для иммунотерапии

онкологического заболевания, включающему или содержащему гуанабенз. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к адьюванту для вакцинации, включающему или содержащему гуанабенз.

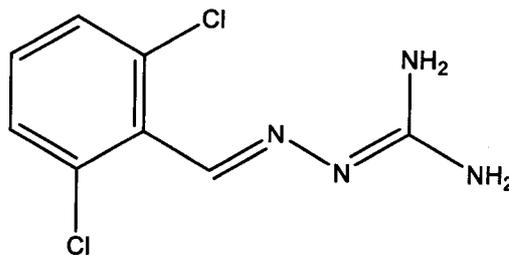
Настоящее изобретение также относится к режиму кондиционирования для иммунотерапии, применяемой в лечении онкологического или инфекционного заболевания, включающему или содержащему гуанабенз. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к режиму кондиционирования для иммунотерапии онкологического заболевания, включающему или содержащему гуанабенз. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к режиму кондиционирования для вакцинации, включающему или содержащему гуанабенз.

Заявитель неожиданно обнаружил, что гуанабенз способен стимулировать иммунный ответ, в особенности, клеточный иммунный ответ. В частности, Заявитель с удивлением обнаружил, что гуанабенз существенно усиливает иммунный ответ, направленный против раковых клеток, как при отдельном применении, так и при применении в сочетании с противораковой иммунотерапией. Как показано в Примерах, приведенных ниже в настоящем документе, инкубирование Т-клеток с гуанабензом *in vitro* приводило к усилению функции Т-клеток, что подтверждается повышенной дегрануляцией Т-клеток и секрецией интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) при распознавании антигена. Более того, введение гуанабенза мышам *in vivo*, в частности, в сочетании с адоптивным переносом Т-клеток, увеличивало инфильтрацию и продолжительность существования Т-клеток в опухолях, а также активность инфильтрирующих опухоль Т-клеток. Введение гуанабенза *in vivo*, в частности, в сочетании с адоптивным переносом Т-клеток, таким образом, приводило к ингибированию роста опухоли и повышению выживаемости. Кроме того, Заявитель с удивлением обнаружил, что гуанабенз усиливает действие вакцинации, проводимой с использованием облученных опухолевых клеток или протеина овальбумина. Действительно, Заявитель обнаружил, что гуанабенз

значительно усиливает специфический иммунный ответ, в особенности, Т-клеточный иммунный ответ, индуцированный иммунизацией. Как показано в Примерах, приведенных ниже в настоящем документе, когда мышей иммунизировали с использованием облученных опухолевых клеток L1210 P1A или рекомбинантного овальбумина, комбинированное введение гуанабенза приводило к повышению ответа на иммунизацию, что подтверждается ростом числа активных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке и крови иммунизированных мышей.

Гуанабенз (номер CAS 5051-62-7) известен также как 2-[(E)-(2,6-дихлорфенил)метиленамино]гуанидин. Другие наименования, используемые для обозначения гуанабенза, включают 2-[(2,6-дихлорфенил)метиленамино]гуанидин; N-(2,6-дихлорбензилиден)-N'-амидиногидразин; 2-((2,6-дихлорфенил)метилен)гидразинкарбосимидамид; гидразинкарбосимидамид, 2-((2,6-дихлорфенил)метилен)-; и WY-8678. Торговые наименования гуанабенза включают, в числе прочего, Wytensin®, Wytens®, Lisapres® и Rexitene®. Иногда гуанабенз обозначают также как GBZ.

Гуанабенз имеет следующую формулу:



В контексте настоящего изобретения термин "гуанабенз" охватывает любые пролекарственные препараты, фармацевтически приемлемые соли, гидраты и сольваты гуанабенза. В частности, термин "гуанабенз" охватывает ацетатные и моноацетатные соли гуанабенза, *например*, гуанабенза ацетат и гуанабенза моноацетат. Термин "гуанабенз" также охватывает кристаллические формы указанных соединений.

Гуанабенз был впервые описан как гербицидное соединение в патентной

заявке GB1019120, опубликованной в 1966 году. С тех пор были изучены способы применения гуанабенса в ветеринарии и в медицине, в первую очередь, в качестве седативного средства или транквилизатора у животных и в качестве гипотензивного средства у людей. Гуанабенз, таким образом, в течение длительного времени использовался в клинической практике для лечения гипертензии. Гуанабенз является агонистом  $\alpha_2$ -адренорецепторов, и его гипотензивное действие, как полагают, обусловлено центральной альфа-адренергической стимуляцией.

Настоящее изобретение относится к гуанабензу, описанному выше, для использования в сочетании с иммунотерапией в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

Другим предметом настоящего изобретения является составной комплект из двух частей, где первая часть включает гуанабенз, а вторая часть включает иммунотерапию для использования в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления составной комплект по настоящему изобретению состоит из первой части, включающей гуанабенз, и второй части, включающей иммунотерапию, например, ингибитор контрольных точек иммунного ответа, для использования в лечении онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

Согласно настоящему изобретению, иммунотерапия определяется как терапия, модулирующая иммунный ответ субъекта с целью индукции и/или усиления иммунного ответа в отношении конкретной цели.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию и/или терапию иммунными клетками с CAR, терапию ингибиторами контрольных точек, терапию агонистами Т-клеток, вакцинацию, например, профилактическую

вакцинацию или терапевтическую вакцинацию, терапию антителами, цитокиновую терапию, или любое сочетание таковых.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию и/или терапию иммунными клетками с CAR, терапию ингибиторами контрольных точек, вакцинацию, например, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию, терапию антителами, или любое сочетание таковых.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию и/или терапию иммунными клетками с CAR, терапию ингибиторами контрольных точек, вакцинацию, например, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию, или любое сочетание таковых.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию, терапию ингибиторами контрольных точек, вакцинацию, например, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию, или любое сочетание таковых.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию и/или терапию иммунными клетками с CAR, вакцинацию, например, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию, или любое сочетание таковых.

В одном варианте осуществления иммунотерапия включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию, или вакцинацию, например, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию.

В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза совместно с противораковой иммунотерапией в лечении онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

Согласно настоящему изобретению, иммунотерапия как лечение онкологических заболеваний, то есть, противораковая иммунотерапия, определяется как терапия, модулирующая иммунный ответ субъекта с целью индукции и/ или усиления иммунного ответа субъекта в отношении раковых клеток.

Одним из основных принципов, лежащих в основе противораковой иммунотерапии, является присутствие антигенов, которые селективно или в больших количествах экспрессируются или мутируют в раковых клетках, таким образом обеспечивая специфическое распознавание и последующее разрушение раковых клеток. Подобные антигены принято называть опухолеспецифическими антигенами. Другим основным принципом, лежащим в основе противораковой иммунотерапии, является присутствие в опухоли лимфоцитов, то есть, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ, англ. TIL), и, в частности, эффекторных TIL, которые могут выбирать мишенью и уничтожать опухолевые клетки посредством распознавания вышеупомянутых опухолеспецифических антигенов.

Примеры противораковой иммунотерапии включают, в числе прочего, адаптивный перенос иммунных клеток; ингибиторы контрольных точек иммунного ответа; агонистов T-клеток, также называемых агонистами контрольных точек иммунного ответа; антитела, включая моноклональные антитела, домены антител, фрагменты антител, биспецифические антитела; цитокины; онколитические вирусы; профилактические и терапевтические вакцины; БЦЖ (бациллы Кальмета - Герена); иммунотерапию, основанную на

РНК-терапии, например, иммунные клетки, модифицированные *ex vivo* посредством РНК-интерференции (RNAi), или вакцины на основании РНК.

В одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию, терапию иммунными клетками с CAR, терапию ингибиторами контрольных точек, терапию агонистами Т-клеток, терапевтическую вакцинацию, терапию антителами, терапию онколитическими вирусами, цитокиновую терапию, или любое сочетание таковых.

Согласно одному варианту осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой адоптивный перенос клеток, также именуемый адоптивной клеточной терапией (оба также именуются АКК), в частности, адоптивный перенос Т-клеток или НК-клеток, также именуемый адоптивной Т-клеточной терапией или адоптивной НК-клеточной терапией, соответственно. Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой адоптивную клеточную терапию, в частности, адоптивную Т-клеточную терапию или адоптивную НК-клеточную терапию.

В контексте настоящего изобретения, адоптивный перенос клеток или адоптивная клеточная терапия определяются как перенос, например, в виде инфузии, иммунных клеток субъекту. В качестве терапии онкологических заболеваний адоптивный перенос иммунных клеток субъекту направлен на усиление иммунного ответа субъекта в отношении раковых клеток.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки

представляют собой Т-клетки или естественные клетки-киллеры (NK-клетки). В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой Т-клетки, в частности, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, и/ или естественные клетки-киллеры (NK-клетки).

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой цитотоксические клетки. Примеры цитотоксических клеток включают естественные клетки-киллеры (NK-клетки), CD8<sup>+</sup> Т-клетки, а также NK Т-клетки.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой естественные клетки-киллеры (NK-клетки).

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой Т-клетки, в частности, эффекторные Т-клетки. Примеры эффекторных Т-клеток включают CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клетки. В другом варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой гамма дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетки.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки представляют собой CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, или NK Т-клетки, предпочтительно переносимыми Т-клетками являются CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой антиген-специфичные иммунные клетки. В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой антиген-специфичные иммунные клетки, где упомянутый антиген специфично и/или в больших количествах экспрессируется раковыми клетками. В одном варианте осуществления, переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой опухолеспецифические иммунные клетки, другими словами, переносимые

иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, специфически распознают раковые клетки или опухолевые клетки при помощи антигена, специфично и/ или в больших количествах экспрессируемого упомянутыми раковыми клетками или опухолевыми клетками. В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой опухолеспецифические эффекторные Т-клетки. В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой опухолеспецифические эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, в частности, опухолеспецифические цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки. В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой опухолеспецифические цитотоксические клетки. В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой опухолеспецифические НК-клетки.

Примеры опухолеспецифических антигенов, *то есть*, антигенов, специфично и/ или в больших количествах экспрессируемых раковыми клетками, включают, в числе прочих, неоантигены (также именуемые новые антигены или мутировавшие антигены), 9D7, ART4, β-катенин, BING-4, Vscr-ab1, BRCA1/2, кальций-активируемый хлоридный канал 2, CDK4, SEA (карциноэмбриональный антиген), CML66, Циклин В1, СурВ, гены, ассоциированные с ВЭБ (вирус Эпштейна-Барр) (например, LMP-1, LMP-2, EBNA1 и BARF1), EGFRvIII, Ep-CAM, EphA3, фибронектин, Gp100/pm117, Her2/neu, ВПЧ (вирус папилломы человека) Е6, ВПЧ Е7, hTERT, IDH1, IDH2, незрелый рецептор ламинина, MC1R, Мелан-А/MART-1, MART-2, мезотелин, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NY-ESO-1/LAGE-2, p53, PRAME, простатспецифический антиген (ПСА), ПСМА (простатспецифический мембранный антиген), Ras, SAP-1, SART-1, SART-2, SART-3, SSX-2, сурвивин, TAG-72, теломеразу, TGF-βRII, TRP-1/-2, тирозиназу, WT1, антигены семейства

BAGE, антигены семейства CAGE, антигены семейства GAGE, антигены семейства MAGE, антигены семейства SAGE, и антигены семейства XAGE.

В контексте настоящего изобретения неоантигены (также именуемые новыми антигенами или мутировавшими антигенами) соответствуют антигенам, происходящим от протеинов, испытавших влияние перестройки генов или соматических мутаций, происходящих в опухолях. Неоантигены могут быть специфичными для каждого отдельного субъекта и, таким образом, обеспечивать цели для разработки персонализированной иммунотерапии. Примеры неоантигенов включают, например, в числе прочих, мутацию R24C в CDK4, мутацию R24L в CDK4, мутацию KRAS в кодоне 12, мутацию p53, мутацию V600E в BRAF и мутацию R132H в IDH1.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, обладают специфичностью к опухолевому антигену, выбранному из группы, содержащей или включающей РТА (раково-тестикулярные антигены, также известные как антигены MAGE-типа), класс неоантигенов и класс вирусных антигенов.

В контексте настоящего изобретения класс РТА соответствует антигенам, кодируемым генами, которые экспрессируются в опухолевых клетках, но не в здоровых тканях, за исключением мужских зародышевых клеток. Примеры РТА включают, в числе прочих, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C2, NY-ESO-1, PRAME и SSX-2.

В контексте настоящего изобретения класс вирусных антигенов соответствует антигенам, которые являются производными вирусных онкогенных протеинов. Примеры вирусных антигенов включают, в числе прочих, антигены, ассоциированные с ВПЧ (вирус папилломы человека), например, E6 и E7, а также антигены, ассоциированные с ВЭБ (вирус Эпштейна-Барр), например, LMP-1, LMP-2, EBNA1 и BARF1.

В одном варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой аутологичные

иммунные клетки, в частности, аутологичные Т-клетки. В другом варианте осуществления переносимые иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой аллогенные (или генетически отличающиеся) иммунные клетки, в частности, аллогенные НК-клетки.

Например, аутологичные Т-клетки могут быть получены *ex vivo* либо путем экспансии антиген-специфичных Т-клеток, полученных от субъекта методом изоляции клеток, либо путем перенацеливания Т-клеток методами генной инженерии.

В одном варианте осуществления иммунные клетки, подлежащие инфузии, модифицируют *ex vivo*, в частности, с помощью РНК-интерференции (RNAi), перед введением субъекту.

Методы выделения Т-клеток, взятых у субъекта, в частности, антиген-специфичных Т-клеток, *например*, опухолеспецифических Т-клеток, хорошо известны в данной области техники (см, например, Rosenberg&Restifo, 2015, Science 348, 62-68; Prickett *и другие авторы*, 2016, Cancer Immunol Res 4, 669-678; или Hinrichs & Rosenberg, 2014, Immunol Rev 257, 56-71). Методы экспансии Т-клеток *ex vivo* хорошо известны в данной области техники (см, например, Rosenberg&Restifo, 2015, Science 348, 62-68; Prickett *и другие авторы*, 2016, Cancer Immunol Res 4, 669-678; или Hinrichs & Rosenberg, 2014, Immunol Rev 257, 56-71). Протоколы инфузионного введения Т-клеток субъекту, включая режимы кондиционирования, предшествующие инфузии, хорошо известны в данной области техники (см, например, Rosenberg&Restifo, 2015, Science 348, 62-68; Prickett *и другие авторы*, 2016, Cancer Immunol Res 4, 669-678; или Hinrichs & Rosenberg, 2014, Immunol Rev 257, 56-71).

В одном варианте осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой терапию иммунными клетками с CAR, в частности, CAR Т-клеточную терапию или CAR НК-клеточную терапию. Таким образом, в одном варианте осуществления

иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапию иммунными клетками с CAR, в частности, CAR Т-клеточную терапию или CAR НК-клеточную терапию.

В контексте настоящего изобретения, терапия иммунными клетками с химерными рецепторами антигена (CAR) представляет собой адоптивную клеточную терапию, где переносимыми клетками являются иммунные клетки, описанные выше в настоящем документе, например, Т-клетки или НК-клетки, модифицированные методами генной инженерии таким образом, чтобы они могли экспрессировать химерный рецептор антигена (CAR). В качестве терапии онкологических заболеваний, адоптивный перенос субъекту иммунных клеток с CAR имеет целью усиление иммунного ответа субъекта в отношении раковых клеток.

Химерные рецепторы антигена (CAR) представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из нацеливающего фрагмента, который связан с одним или несколькими сигнальными доменами в одну слитую молекулу или в несколько молекул. Говоря в общем, связывающий фрагмент CAR состоит из антиген-связывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), включающего легкие и переменные фрагменты моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Связывающие фрагменты на рецепторе или лигандах также успешно используются. Сигнальные домены первого поколения CAR, как правило, получают из цитоплазматической области цепей CD3-дзета или Fc-гамма рецептора. Первое поколение CAR успешно справлялось с перенаправлением цитотоксичности Т-клеток, однако, не сумело обеспечить пролонгированную экспансию и противоопухолевую активность *in vivo*. Поэтому, для повышения выживаемости и повышения пролиферации получаемых CAR Т-клеток, в следующие поколения CAR добавляли сигнальные домены из костимулирующих молекул, включая CD28, OX-40 (CD134) и 4-1BB (CD137): отдельно (второе поколение) или в комбинации

(третье поколение).

Таким образом, в одном варианте осуществления, переносимые Т-клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой CAR Т-клетки. Экспрессия CAR позволяет перенацелить Т-клетки против выбранного антигена, например, антигена, экспрессируемого на поверхности раковых клеток. В одном варианте осуществления переносимые CAR Т-клетки распознают опухолеспецифический антиген.

В другом варианте осуществления переносимые NK-клетки, описанные выше в настоящем документе, представляют собой CAR NK-клетки. Экспрессия CAR позволяет перенацелить NK-клетки против выбранного антигена, например, антигена, экспрессируемого на поверхности раковых клеток. В одном варианте осуществления переносимые CAR NK-клетки распознают опухолеспецифический антиген.

Примеры опухолеспецифических антигенов приведены ниже.

В одном варианте осуществления переносимые CAR Т-клетки или CAR NK-клетки распознают опухолеспецифический антиген, выбранный из группы, содержащей или включающей EGFR и, в частности, EGFRvIII, мезотелин, ПСМА, ПСА, CD47, CD70, CD133, CD171, CEA, FAP, GD2, HER2, IL-13R $\alpha$ ,  $\alpha$ v $\beta$ 6-интегрин, ROR1, MUC1, GPC3, EphA2, CD19, CD21, и CD20.

В одном варианте осуществления иммунные клетки с CAR, описанные выше в настоящем документе, представляют собой аутологичные иммунные клетки с CAR, в частности, аутологичные CAR Т-клетки. В другом варианте осуществления иммунные клетки с CAR, описанные выше в настоящем документе, представляют собой аллогенные иммунные клетки с CAR, в частности, аллогенные CAR NK-клетки.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает или содержит, по крайней мере, один ингибитор контрольных точек. Таким

образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек.

В контексте настоящего изобретения терапия ингибиторами контрольных точек определяется как введение субъекту, по крайней мере, одного ингибитора контрольных точек.

Ингибиторы контрольных точек [иммунного ответа] (которые также могут именоваться ингибиторами иммунных контрольных точек (ИКТ)) блокируют взаимодействие между ингибиторными рецепторами, экспрессируемыми на Т-клетках, и их лигандами. В качестве противораковой терапии, терапия ингибиторами контрольных точек направлена на предотвращение активации ингибиторных рецепторов, экспрессируемых на Т-клетках, лигандами, экспрессируемыми опухолевыми клетками. Терапия ингибиторами контрольных точек, таким образом, направлена на предотвращения ингибирования Т-клеток, присутствующих в опухоли, *то есть*, инфильтрирующих опухоль Т-клеток, и, следовательно, на усиление иммунного ответа субъекта в отношении опухолевых клеток.

Примеры ингибиторов контрольных точек включают, в числе прочих, ингибиторы рецептора клеточной поверхности PD-1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток), также известного как CD279 (кластер дифференцировки 279); ингибиторы лиганда PD-L1 (лиганд 1 запрограммированной гибели клеток), также известного как CD274 (кластер дифференцировки 274) или B7-H1 (B7-гомолог 1); ингибиторы рецептора клеточной поверхности CTLA4 или CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный протеин 4), также известного как CD152 (кластер дифференцировки 152); ингибиторы IDO (индолеамин-2,3-диоксигеназа) и ингибиторы TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа); ингибиторы LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов), также известного как CD223 (кластер

дифференцировки 223); ингибиторы TIM-3 (протеин 3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина), также известного как HAVCR2 (клеточный рецептор 2 вируса гепатита А) или CD366 (кластер дифференцировки 366); ингибиторы TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), также известного как VSIG9 (протеин 9, содержащий домены V-Set и иммуноглобулина) или VSTM3 (протеин 3, содержащий домен V-Set и трансмембранный домен); ингибиторы BTLA (В- и Т-лимфоцитарный аттенюатор), также известного как CD272 (кластер дифференцировки 272); ингибиторы CEACAM-1 (молекула адгезии 1, связанная с карциноэмбриональным антигеном), также известной как CD66a (кластер дифференцировки 66a).

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей ингибиторы PD-1, ингибиторы PD-L1, ингибиторы CTLA-4, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181, JNJ-63723283, BI 754091, MAG012, TSR-042, AGEN2034, авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, LY3300054, ипилимумаб, тремелимуаб, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181, JNJ-63723283, авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, ипилимумаб, тремелимуаб, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор PD-1, также именуемый анти-PD-1.

Ингибиторы PD-1 могут включать антитела, мишенью которых является PD-1, в частности, моноклональные антитела, и ингибиторы, не являющиеся антителами, например, низкомолекулярные ингибиторы.

Примеры ингибиторов PD-1 включают, в числе прочих, пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181, JNJ-63723283, BI 754091, MAG012, TSR-042, и AGEN2034.

Пембролизумаб также известен как МК-3475, MK03475, ламбролизумаб, или SCH-900475. Торговое наименование пембролизумаба Keytruda®.

Ниволумаб также известен как ONO-4538, BMS-936558, MDX1106, или GTPL7335. Торговое наименование ниволумаба Opdivo®.

Цемиплимаб также известен как REGN2810 или REGN-2810.

Тислелизумаб также известен как BGB-A317.

Спартализумаб также известен как PDR001 или PDR-001.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181, JNJ-63723283, BI 754091, MAG012, TSR-042, AGEN2034, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181, JNJ-63723283, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор PD-L1, также именуемый анти-PD-L1.

Ингибиторы PD-L1 могут включать антитела, мишенью которых является PD-L1, в частности, моноклональные антитела, и ингибиторы, не являющиеся антителами, например, низкомолекулярные ингибиторы.

Примеры ингибиторов PD-L1 включают, в числе прочих, авелумаб,

атезолизумаб, дурвалумаб и LY3300054.

Авелумаб также известен как MSB0010718C, MSB-0010718C, MSB0010682, или MSB-0010682. Торговое наименование авелумаба Bavencio®.

Атезолизумаб также известен как MPDL3280A (клон YW243.55.S70), MPDL-3280A, RG-7446 или RG7446. Торговое наименование атезолизумаба Tecentriq®.

Дурвалумаб также известен как MEDI4736 или MEDI-4736. Торговое наименование дурвалумаба Imfinzi®.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, LY3300054, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор CTLA-4, также именуемый анти-CTLA-4.

Ингибиторы CTLA-4 могут включать антитела, мишенью которых является CTLA-4, в частности, моноклональные антитела, и ингибиторы, не являющиеся антителами, например, низкомолекулярные ингибиторы.

Примеры ингибиторов CTLA-4 включают, в числе прочих, ипилимумаб и тремелимумаб.

Ипилимумаб также известен как BMS-734016, MDX-010, или MDX-101. Торговое наименование ипилимумаба Yervoy®.

Тремелимумаб также известен как тицилимумаб, CP-675, или CP-675,206.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек выбран из группы, содержащей или включающей ипилимумаб, тремелимумаб, и любые сочетания таковых.

В одном варианте осуществления упомянутый, по меньшей мере, один ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор IDO или ингибитор TDO, также именуемые как анти-IDO и анти-TDO, соответственно.

Примеры ингибиторов IDO включают, в числе прочих, 1-метил-D-триптофан (также известный как индоксимод), эпакадостат (также известный как INCB24360), навоксимод (также известный как IDO-IN-7 или GDC-0919), линродостат (также известный как BMS-986205), PF-06840003 (также известный как EOS200271), TPST-8844, и LY3381916.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает или содержит, по крайней мере, одного агониста Т-клеток (иногда также называемого агонистом контрольных точек). Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапию агонистами Т-клеток.

В контексте настоящего изобретения, терапия агонистами Т-клеток определяется как введение субъекту, по крайней мере, одного агониста Т-клеток.

Агонисты Т-клеток действуют путем активации стимулирующих рецепторов, экспрессируемых на иммунных клетках, например, Т-клетках. В контексте настоящего изобретения термин «стимулирующие рецепторы» означает рецепторы, индуцирующие стимулирующий сигнал при активации, что приводит к усилению иммунного ответа. В качестве противораковой терапии, терапия ингибиторами контрольных точек направлена на активацию стимулирующих рецепторов, экспрессируемых на иммунных клетках, присутствующих в опухоли. В частности терапия агонистами Т-клеток направлена на усиление активации Т-клеток, присутствующих в опухоли, *то есть*, инфильтрирующих опухоль Т-клеток, и, таким образом, на усиление

иммунного ответа субъекта в отношении опухолевых клеток. В настоящее время определен ряд потенциальных целей для терапии агонистами Т-клеток.

Примеры агонистов Т-клеток включают, в числе прочих, агонистов CD137 (кластер дифференцировки 137) также известного как 4-1BB или TNFRS9 (9-й член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли); агонистов рецептора OX40, также известного как CD134 (кластер дифференцировки 134) или TNFRSF4 (4-й член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли); агонистов GITR (протеин, связанный с семейством глюкокортикоид-индуцированных рецепторов ФНО); агонистов ICOS (индуцируемый костимулятор); агонистов CD27-CD70 (кластер дифференцировки 27- кластер дифференцировки 70); и агонистов CD40 (кластер дифференцировки 40).

В одном варианте осуществления вышеупомянутый, по крайней мере, один агонист Т-клеток выбран из группы, содержащей или включающей агонистов CD137, агонистов OX40, агонистов GITR, агонистов ICOS, агонистов CD27-CD70, агонистов CD40, и любые сочетания таковых.

Примеры агонистов CD137 включают, в числе прочих, утомилумаб и урелумаб.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает или содержит вакцину. Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой вакцинацию.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает или содержит терапевтическую вакцину (иногда также называемую лечебной вакциной). Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая

для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапевтическую вакцинацию.

В контексте настоящего изобретения терапевтическая вакцинация определяется как введение, по крайней мере, одного опухолеспецифического антигена (*например*, длинного синтетического пептида, или SLP), или нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый опухолеспецифический антиген; введение рекомбинантных вирусных векторов, селективно проникающих в клетки опухоли и/или реплицирующихся в них; введение опухолевых клеток; и/или введение иммунных клеток (*например*, дендритных клеток), модифицированных с целью презентации опухолеспецифических антигенов и инициации иммунного ответа, направленного против этих антигенов.

В качестве противораковой терапии, терапевтические вакцины имеют целью усиление иммунного ответа субъекта в отношении опухолевых клеток.

Примеры терапевтических вакцин, направленных на усиление иммунного ответа субъекта в отношении опухолевых клеток, включают, в числе прочих, терапевтические вакцины на основе вирусных векторов, например, аденовирусов (*например*, онколитические аденовирусы), вирусов осповакцины (*например*, модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA)), альфавирусов (*например*, вирус лихорадки леса Семлики (SFV)), вируса кори, вируса простого герпеса (HSV), и вируса Коксаки; вакцины на основе длинных синтетических пептидов (SLP); вакцины на основе РНК, и вакцины на основе дендритных клеток.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой терапию антителами. Таким образом, в одном варианте осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического

заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапию антителами.

В контексте настоящего изобретения терапия антителами определяется как введение субъекту, по крайней мере, одного антитела.

В качестве противораковой терапии, терапия антителами направлена на усиление иммунного ответа субъекта в отношении опухолевых клеток, в частности, посредством выбора раковых клеток как клеток-мишеней для разрушения, путем стимулирования активации Т-клеток, присутствующих в опухоли или путем предотвращения ингибирования Т-клеток, присутствующих в опухоли; или [подобная терапия антителами] направлена на ингибирование роста или распространения раковых клеток.

В контексте настоящего изобретения «терапия антителами» может включать введение моноклональных антител, поликлональных антител, многоцепочечных антител, одноцепочечных антител, однодоменных антител, фрагментов антител, доменов антител, миметиков антител или мультиспецифических антител, например, биспецифических антител.

В одном варианте осуществления, предназначение или цель антитела состоит в направленном воздействии на раковые клетки или опухолевые клетки для разрушения последних.

Примеры антител, в частности, моноклональных антител, направленно воздействующих на раковые клетки или опухолевые клетки для разрушения последних, включают опухолеспецифические антитела, в частности, опухолеспецифические моноклональные антитела. Примеры опухолеспецифических антител включают, в числе прочих, антитела, направленно воздействующие на поверхностные маркеры раковых клеток или опухолевых клеток, антитела, направленно воздействующие на протеины, вовлеченные в процессы роста или распространения раковых клеток или опухолевых клеток.

В одном варианте осуществления предназначение или цель антитела

состоит в стимулировании активации Т-клеток, присутствующих в опухоли.

Примеры антител, в частности, моноклональных антител, стимулирующих активацию присутствующих в опухоли Т-клеток, включают, в числе прочих, антитела к CD137 и антитела к OX40, описанных выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предназначение или цель антитела состоит в предотвращении ингибирования Т-клеток, присутствующих в опухоли.

Примеры антител, в частности, моноклональных антител, предотвращающих ингибирование присутствующих в опухоли Т-клеток, включают, в числе прочих, антитела к PD-1 (например, пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб и спартализумаб), антитела к PD-L1 (например, авелумаб, атезолизумаб и дурвалумаб) и антитела к CTLA-4 (например, ипилимумаб и тремелимумаб), описанные выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предназначение или цель антитела состоит в ингибировании роста или распространения раковых клеток.

Примеры антител, ингибирующих рост или распространение раковых клеток, включают, в числе прочих, антитела к HER2 (например, трастузумаб).

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой терапию онколитическими вирусами. Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой терапию онколитическими вирусами.

В контексте настоящего изобретения терапия онколитическими вирусами определяется как введение субъекту, по крайней мере, одного онколитического вируса.

Онколитические вирусы определяются как вирусы, которые инфицируют и уничтожают преимущественно раковые клетки, а не здоровые клетки, не являющиеся раковыми. В качестве противораковой терапии, терапия онколитическими вирусами направлена на уничтожение раковых клеток и/или инициирование или усиление иммунного ответа в отношении раковых клеток.

Примеры онколитических вирусов включают, в числе прочих, модифицированные вирусы простого герпеса 1 типа, например, талимоген лагерпарепвек (также известный как T-VEC) или HSV-1716; модифицированные аденовирусы, например, Ad5-DNX-2401; модифицированные вирусы кори, например, MV-NIS; модифицированные вирусы осповакцины (VV), например, вирус осповакцины TG6002; и модифицированные полиовирусы, например, PVS-RIPO.

В соответствии с одним вариантом осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой цитокиновую терапию. Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения онкологического заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой цитокиновую терапию.

В контексте настоящего изобретения цитокиновая терапия определяется как введение субъекту, по крайней мере, одного цитокина, в частности, рекомбинантного цитокина.

В качестве противораковой терапии, цитокиновая терапия направлена на усиление иммунного ответа субъекта в отношении раковых клеток, в частности, путем стимулирования активации иммунных клеток.

Примеры цитокинов, которые могут вводиться субъекту в качестве цитокиновой терапии, включают, в числе прочих, интерлейкин-2 (IL-2) и интерферон альфа (IFN- $\alpha$ ).

В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение

относится к использованию гуанабенза совместно с иммунотерапией в лечении инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

Согласно настоящему изобретению, иммунотерапия в качестве терапии инфекционного заболевания определяется как терапия, модулирующая иммунный ответ субъекта с целью индукции и/ или усиления иммунного ответа субъекта в отношении возбудителя данного инфекционного заболевания.

Примеры иммунотерапии, используемой в лечении инфекционного заболевания, включают, в числе прочих, профилактическую вакцину, терапевтическую вакцину, моноклональные антитела, цитокины, адоптивный перенос Т-клеток, трансфузию гранулоцитов, и ингибиторы контрольных точек.

В одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения инфекционного заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает в себя или представляет собой профилактическую вакцинацию, терапевтическую вакцинацию, терапию посредством адоптивного переноса Т-клеток, терапию антителами, или любые сочетания таковых.

В соответствии с одним вариантом осуществления, иммунотерапия, применяемая для лечения инфекционного заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, включает или содержит вакцину, в том числе, профилактическую вакцину или терапевтическую вакцину. Таким образом, в одном варианте осуществления иммунотерапия, применяемая для лечения инфекционного заболевания в сочетании с гуанабензом, описанным выше в настоящем документе, представляет собой вакцинацию, в частности, профилактическую вакцинацию или терапевтическую вакцинацию.

Настоящее изобретение относится к использованию гуанабенза в качестве адьюванта для иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе, в

частности, для противораковой иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе, или вакцинации, описанной выше в настоящем документе.

Таким образом, согласно настоящему изобретению, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, используется в качестве адъюванта для иммунотерапии, в частности, противораковой терапии, или вакцинации. Другими словами, согласно настоящему изобретению, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, усиливает действие иммунотерапии, в частности, противораковой терапии, или вакцинации.

В одном варианте осуществления усиление действия иммунотерапии в присутствии адъюванта, в частности, противораковой терапии, или вакцинации, определяется путем сравнения с действием иммунотерапии, в частности, противораковой терапии, или вакцинации, применяемой без гуанабенза.

В одном варианте осуществления упомянутое усиление действия иммунотерапии, которое оказывает адъювант, *то есть*, гуанабенз, определяется как, по крайней мере, одно из нижеследующего, наблюдаемое у субъекта, получающего вышеупомянутую противораковую иммунотерапию:

- Повышение числа лимфоцитов (*например*, цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток или НК-клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль эффекторных лимфоцитов;

- Усиление активации лимфоцитов (*например*, цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток или НК-клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль эффекторных лимфоцитов;

- Повышение приспособленности лимфоцитов (*например*, цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток или НК-клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль эффекторных лимфоцитов, где приспособленность оценивается как запускаемая рецепторами Т-клеток (TCR) активация сигнального пути, пролиферация и/ или производство цитокинов упомянутыми лимфоцитами и/ или как выживание упомянутых лимфоцитов;

- Повышение выживаемости или персистенция лимфоцитов (*например*,

цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток или NK-клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль эффекторных лимфоцитов;

- Снижение числа супрессорных иммунных клеток, например, супрессорных миелоидных клеток (например, МЛСК и/ или опухоль-ассоциированных макрофагов) и/ или супрессорных лимфоцитов (например, Т-регуляторных клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль супрессорных иммунных клеток;

- Снижение активации супрессорных иммунных клеток, например, супрессорных миелоидных клеток (например, МЛСК и/ или опухоль-ассоциированных макрофагов) и/ или супрессорных лимфоцитов (например, Т-регуляторных клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль супрессорных иммунных клеток;

- Уменьшение приспособленности супрессорных иммунных клеток, например, супрессорных миелоидных клеток (например, МЛСК и/ или опухоль-ассоциированных макрофагов) и/ или супрессорных лимфоцитов (например, Т-регуляторных клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль супрессорных иммунных клеток; где приспособленность оценивается как активация, пролиферация и/ или производство цитокинов упомянутыми супрессорными иммунными клетками и/ или как выживание упомянутых супрессорных иммунных клеток;

- Снижение выживаемости супрессорных иммунных клеток, например, супрессорных миелоидных клеток (например, МЛСК и/ или опухоль-ассоциированных макрофагов) и/ или супрессорных лимфоцитов (например, Т-регуляторных клеток), в частности, инфильтрирующих опухоль супрессорных иммунных клеток;

- Снижение роста опухоли и/ или размера опухоли; и/ или

- Повышение выживаемости.

Вышеперечисленные параметры хорошо известны специалистам в данной области техники. Более того, методы определения числа, активации,

приспособленности и/ или выживаемости лимфоцитов, например, Т-клеток или НК-клеток, широко применяются в данной области техники. Подобные методы включают, например анализ взятого у субъекта образца, в частности, образца опухоли, методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) (см., например *Zhu и другие авторы, 2017, Nat Commun 8, 1404*).

В одном варианте осуществления упомянутое усиление действия вакцинации, которое оказывает адъювант, *то есть*, гуанабенз, определяется как, по крайней мере, одно из нижеследующего, наблюдаемое у субъекта, получающего вышеупомянутую вакцинацию:

- Повышение числа эффекторных лимфоцитов, например, цитотоксических  $CD8^+$  Т-клеток, в частности, специфических эффекторных лимфоцитов;

- Усиление активации эффекторных лимфоцитов, например, цитотоксических  $CD8^+$  Т-клеток, в частности, специфических эффекторных лимфоцитов;

- Повышение числа антиген-специфических антител.

Вышеперечисленные параметры хорошо известны специалистам в данной области техники. Более того, методы определения числа, активации, выживаемости лимфоцитов, широко применяются в данной области техники. Подобные методы включают, например анализ взятого у субъекта образца, в частности, образца крови или образца опухоли, методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Согласно настоящему изобретению, гуанабенз подлежит введению одновременно, отдельно или последовательно в отношении иммунотерапии, в частности, противораковой иммунотерапии, или вакцинации, для которых он используется в качестве адъюванта.

Настоящее изобретение также относится к использованию гуанабенза в качестве режима кондиционирования для последующей иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе, в частности, противораковой

иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе (другими словами, гуанабенз используется как режим кондиционирования для подготовки субъекта к проведению последующей иммунотерапии, в частности, противораковой иммунотерапии).

В одном варианте осуществления, гуанабенз, таким образом, подлежит введению до иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной иммунотерапии, терапии ингибиторами контрольных точек, или вакцинации. В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до и параллельно иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной иммунотерапии, терапии ингибиторами контрольных точек, или вакцинации. В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной иммунотерапии, терапии ингибиторами контрольных точек, или вакцинации, и без перерыва в течение длительного времени после.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод модулирования иммунного ответа, в частности, клеточного иммунного ответа, у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя введение субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод модулирования иммунного ответа, в частности, клеточного иммунного ответа, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективной дозы гуанабенза.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод стимулирования или усиления иммунного ответа, в частности, клеточного иммунного ответа, у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя введение субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод стимулирования или усиления иммунного ответа, в частности, клеточного

иммунного ответа, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективной дозы гуанабенза.

В одном варианте осуществления иммунный ответ, в частности, клеточный иммунный ответ, представляет собой Т-клеточный ответ или НК-клеточный ответ. В одном варианте осуществления Т-клеточный ответ представляет собой альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клеточный ответ или гамма дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клеточный ответ. В одном варианте осуществления Т-клеточный ответ представляет собой цитотоксический Т-клеточный ответ.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод подготовки субъекта к иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной терапии, при этом упомянутый метод включает в себя введение нуждающемуся в иммунотерапии субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод по настоящему изобретению предназначен для подготовки субъекта к иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной терапии, при этом упомянутая иммунотерапия применяется в качестве терапии онкологического или инфекционного заболевания.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод для подготовки субъекта к иммунотерапии, в частности, адоптивной клеточной терапии, включает в себя введение нуждающемуся в этом субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где терапевтически эффективная доза гуанабенза вводится субъекту до, параллельно и/ или без перерыва в течение определенного времени после проведения субъекту иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод усиления действия иммунотерапии у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя введение субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод по настоящему изобретению предназначен для усиления действия иммунотерапии в лечении онкологического или инфекционного заболевания.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод усиления действия иммунотерапии у нуждающегося в этом субъекта включает в себя введение субъекту гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где терапевтически эффективная доза гуанабенза вводится субъекту до, параллельно и/ или без перерыва в течение определенного времени после проведения субъекту иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод лечения онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя проведение субъекту иммунотерапии и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где упомянутый гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования, таким образом, подготавливая субъекта к проведению иммунотерапии, и/ или в качестве адъюванта для иммунотерапии, таким образом, усиливая действие иммунотерапии.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод лечения онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта включает в себя проведение субъекту иммунотерапии и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где терапевтически эффективная доза гуанабенза вводится субъекту до, параллельно и/ или без перерыва в течение определенного времени после проведения субъекту иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя проведение субъекту иммунотерапии и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где упомянутый гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования,

таким образом, подготавливая субъекта к проведению иммунотерапии, и/ или в качестве адъюванта для иммунотерапии, таким образом, усиливая действие иммунотерапии.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта включает в себя проведение субъекту иммунотерапии и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где терапевтически эффективная доза гуанабенза вводится субъекту до, параллельно и/ или без перерыва в течение определенного времени после проведения субъекту иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой метод лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом упомянутый метод включает в себя проведение субъекту иммунотерапии, в частности, вакцинации, и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где упомянутый гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования, таким образом, подготавливая субъекта к проведению иммунотерапии, и/ или в качестве адъюванта для иммунотерапии, таким образом, усиливая действие иммунотерапии.

В соответствии с одним вариантом осуществления, упомянутый метод лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта включает в себя проведение субъекту иммунотерапии, в частности, вакцинации, и введение гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, где терапевтически эффективная доза гуанабенза вводится субъекту до, параллельно и/ или без перерыва в течение определенного времени после проведения субъекту иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для модулирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для стимулирования или усиления иммунного ответа, в частности, клеточного иммунного ответа, у нуждающегося в этом субъекта.

В одном варианте осуществления, иммунный ответ, в частности, клеточный иммунный ответ, представляет собой Т-клеточный ответ или НК-клеточный ответ. В одном варианте осуществления Т-клеточный ответ представляет собой альфа бета ( $\alpha\beta$ ) Т-клеточный ответ или гамма дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клеточный ответ. В одном варианте осуществления Т-клеточный ответ представляет собой цитотоксический Т-клеточный ответ.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для подготовки субъекта к последующему проведению иммунотерапии. В одном варианте осуществления упомянутая иммунотерапия представляет собой противораковую иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для усиления действия иммунотерапии у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления, упомянутая иммунотерапия представляет собой противораковую иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для лечения онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом

субъекта, где упомянутый медицинский препарат используется в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии, впоследствии проводимой субъекту

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для лечения онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где упомянутый медицинский препарат используется в качестве адьюванта для иммунотерапии, проводимой или подлежащей проведению субъекту.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для лечения онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта в сочетании с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта в сочетании с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой использование гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, для производства медицинского препарата, предназначенного для лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта в сочетании с иммунотерапией, в частности, вакцинацией, описанной выше в настоящем документе.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, включающую в себя гуанабенз, описанный

выше в настоящем документе, и, по крайней мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для использования в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где упомянутая фармацевтическая композиция используется в качестве адъюванта или режима кондиционирования для иммунотерапии.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция для использования в лечении онкологического или инфекционного заболевания в соответствии с настоящим изобретением, включает гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, по крайней мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, например, ингибитор контрольных точек.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой составной комплект для использования в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий первую часть, содержащую фармацевтическую композицию, имеющую в своем составе гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, и, по крайней мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и вторую часть, содержащую иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, например, ингибитор контрольных точек.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые могут быть использованы в составе фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, в числе прочих, ионообменники, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, например, сывороточный альбумин человека, буферные вещества, например, фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, парциальные смеси глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, например, протаминсульфат, динатрия гидрофосфат, дикалия гидрофосфат, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например, натрий-

карбоксиметилцеллюлоза), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Другой предмет настоящего изобретения представляет собой медицинский препарат, включающий гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, или фармацевтическую композицию, описанную выше в настоящем документе, или составной комплект, описанный выше в настоящем документе, для использования в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где упомянутый медицинский препарат используется в качестве адъюванта или в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии.

Как указано ранее, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, подлежит введению одновременно, отдельно или последовательно в отношении иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе, для которой он используется в качестве адъюванта или режима кондиционирования.

В одном варианте осуществления, гуанабенз, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, медицинский препарат по настоящему изобретению, или составной комплект по настоящему изобретению будут включены в состав лекарственной формы для введения субъекту. Гуанабенз, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению могут вводиться перорально, парентерально, местно и наружно, посредством ингаляционного спрея, ректально, назально, буккально, вагинально, или через имплантируемое депо.

В соответствии с одним вариантом осуществления, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, находится в форме, адаптированной для перорального введения. Таким образом, в одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению субъекту перорально, например, в виде порошка,

таблетки, капсулы, и так далее, или в виде таблетки, специально разработанной для пролонгированного или медленного высвобождения.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению находится в форме, адаптированной для перорального введения. Другими словами, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз и, опционально, иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, в форме, адаптированной для перорального введения.

Примеры форм, адаптированных для перорального введения, включают, в числе прочих, жидкие, пастообразные или твердые композиции, и, более конкретно, таблетки, таблетки, специально разработанные для пролонгированного или медленного высвобождения, капсулы, пилюли, драже, жидкости, гели, сиропы, пасты и суспензии.

В соответствии с другим вариантом осуществления гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, находится в форме, адаптированной для инъекции. Таким образом, в одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению субъекту путем внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутривезикулярной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению находится в форме, адаптированной для инъекции, например, для внутривенной, подкожной, внутримышечной, трансдермальной, внутрикожной инъекции или инфузии. Другими словами, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз и, опционально, иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, в форме, адаптированной для инъекции, например, для

внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутривидеальной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии.

Стерильные инъекционные формы гуанабенза, фармацевтической композиции или медицинского препарата по настоящему изобретению могут представлять собой растворы или водные или масляные суспензии. Такие суспензии могут быть включены в состав лекарственной формы в соответствии с методами, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном фармацевтически приемлемом разбавителе или растворителе. К числу приемлемых несущих сред и растворителей, которые могут быть использованы, относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды часто используются стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Для изготовления инъекционных форм могут использоваться как жирные кислоты, например, олеиновая кислота и ее глицеридные производные, так и натуральные фармацевтически приемлемые масла, например, оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных вариантах. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать длинноцепочечный спиртовой разбавитель или диспергирующее вещество, например, карбоксиметилцеллюлозу или аналогичные диспергирующие вещества, которые обычно используются в рецептуре фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие часто используемые поверхностно-активные вещества, например, эмульгаторы серий Tween и Span, и иные эмульгирующие вещества или усилители биодоступности, которые обычно применяются в производстве фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других

лекарственных форм, также могут использоваться для целей создания рецептуры.

В соответствии с другим вариантом осуществления, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, находится в форме, адаптированной для парентерального введения. Таким образом, в одном варианте осуществления гуанабенз подлежит парентеральному введению.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению находится в форме, адаптированной для парентерального введения. Другими словами, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз и, опционально, иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, в форме, адаптированной для парентерального введения.

В соответствии с другим вариантом осуществления, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, находится в форме, адаптированной для местного и наружного применения. Таким образом, в одном варианте осуществления, гуанабенз подлежит введению местно и наружно.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению находится в форме, адаптированной для местного и наружного применения. Другими словами, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, и, опционально, иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, в форме, адаптированной для местного и наружного применения.

Примеры форм, адаптированных для местного и наружного применения, включают, в числе прочих, жидкие, пастообразные или твердые композиции, и, более конкретно, водные растворы, капли, дисперсии, спреи, микрокапсулы, микро- и наночастицы, полимерные пластыри, или пластыри с

контролируемым высвобождением, и тому подобное.

В соответствии с другим вариантом осуществления, гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, находится в форме, адаптированной для ректального введения. Таким образом, в одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению ректально.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению находится в форме, адаптированной для ректального введения. Другими словами, фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, и, опционально, иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, в форме, адаптированной для ректального введения.

Примеры форм, адаптированных для ректального введения, включают, в числе прочего, суппозитории, микроклизмы, клизмы, гели, ректальные пены, кремы, мази, и тому подобное.

В соответствии с одним вариантом осуществления, составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, который находится в форме, адаптированной для перорального введения, и иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, которая находится в форме, адаптированной для инъекции, например, для внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутриплевральной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии. Таким образом, в одном варианте осуществления составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, который подлежит введению субъекту перорально, и иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, которая подлежит введению субъекту путем инъекции, например, внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутриплевральной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии.

В соответствии с другим вариантом осуществления, составной комплект

по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, который находится в форме, адаптированной для инъекции, например, для внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутривезикулярной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии, и иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, которая находится в форме, адаптированной для перорального введения. Таким образом, в одном варианте осуществления составной комплект по настоящему изобретению содержит гуанабенз, описанный выше в настоящем документе, подлежащий введению субъекту путем инъекции, например, внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, внутривезикулярной, подкожной, трансдермальной инъекции или инфузии, и иммунотерапию, описанную выше в настоящем документе, которая подлежит введению субъекту перорально.

В одном варианте осуществления, гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии и/или одновременно с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе. В другом варианте осуществления гуанабенз подлежит введению в период от одной недели до одного часа перед иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе, предпочтительно за один день до иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой адоптивную клеточную терапию, и гуанабенз подлежит введению до дня (дней), или в тот же день (дни), в который проводится перенос иммунных клеток, описанных выше в настоящем документе. В другом варианте осуществления иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, и гуанабенз подлежит введению до дня (дней), или в тот же день (дни), в который проводится введение ингибитора контрольных точек, описанного выше в настоящем документе. В другом варианте осуществления иммунотерапия представляет собой вакцинацию, и гуанабенз подлежит введению до дня (дней), или в тот же день (дни), в который проводится

вакцинация, описанная выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе, однократно, двухкратно, трехкратно или более раз.

В одном варианте осуществления, гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии и/или одновременно с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе, и без перерыва в течение определенного времени после нее.

В одном варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии или одновременно с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе, и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 дней после. В другом варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии или одновременно с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе, и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 недель после. В другом варианте осуществления гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии или одновременно с иммунотерапией, описанной выше в настоящем документе, и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 месяцев после.

В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой адоптивную клеточную терапию, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой адоптивной клеточной терапией и без перерыва в течение определенного времени после. В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой адоптивную клеточную терапию, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой адоптивной клеточной терапией и и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 недель после.

В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой терапией ингибиторами контрольных точек.

В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой терапией ингибиторами контрольных точек и без перерыва в течение определенного времени после. В другом варианте осуществления иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, и гуанабенз подлежит введению до или одновременно с упомянутой терапией ингибиторами контрольных точек и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 недель после.

В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой вакцинацию, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой вакцинацией. В другом варианте осуществления иммунотерапия представляет собой вакцинацию, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой вакцинацией и без перерыва в течение определенного времени после. В другом варианте осуществления иммунотерапия представляет собой вакцинацию, и гуанабенз подлежит введению до и/или одновременно с упомянутой вакцинацией и затем в течение, по крайней мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 недель после.

В соответствии с одним вариантом осуществления, терапевтически эффективная доза гуанабенза, описанная выше в настоящем документе, подлежит введению для применения в лечении онкологического или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где упомянутый гуанабенз используется в качестве адъюванта или в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии. Таким образом, в одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, медицинский препарат или составной комплект по настоящему изобретению содержит терапевтически эффективную дозу гуанабенза, описанного выше в настоящем документе, и, опционально, терапевтически эффективную дозу иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Понятно, что суммарную суточную дозу гуанабенза будет определять

лечащий врач в рамках обоснованного медицинского врачебного решения. Конкретная доза для каждого конкретного субъекта будет зависеть от ряда факторов, например, от онкологического или инфекционного заболевания, подлежащего лечению; возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и особенностей питания пациента; и других подобных факторов, хорошо известных специалистам в области медицины.

В одном варианте осуществления, субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 0,01 мг на килограмм массы тела (мг/кг) до приблизительно 30 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 7 мг/кг. В другом варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 4,5 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 0,01 мг на килограмм массы тела в день (мг/кг/день) до приблизительно 30 мг/кг/день, предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг/день до приблизительно 15 мг/кг/день, более предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг/день до приблизительно 7 мг/кг/день. В другом варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу,

лежащую в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг/день до приблизительно 4,5 мг/кг/день, предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг/день до приблизительно 2 мг/кг/день, более предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг/день до приблизительно 1 мг/кг/день.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 2 000 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 1 000 мг, более предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 320 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 150 мг. В другом варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 70 мг.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 2 000 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг, более предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой

суточную дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 320 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 150 мг. В другом варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, лежащую в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг, предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 70 мг.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную, по крайней мере, приблизительно 0,01; 0,02; 0,07; 0,15; 0,30; 0,42; 0,55; 0,70 или 0,85 мг/кг. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную, по крайней мере, приблизительно 0,01; 0,02; 0,07; 0,15; 0,30; 0,42; 0,55; 0,70 или 0,85 мг/кг/день.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную, по крайней мере, приблизительно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мг. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, равную, по крайней мере, приблизительно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мг.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную приблизительно 0,057; 0,115; 0,23; 0,46 или 0,92 мг/кг. В одном

варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную приблизительно 0,057; 0,115; 0,23; 0,46 или 0,92 мг/кг/день.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой дозу, равную приблизительно 4, 8, 16, 32 или 64 мг. В одном варианте осуществления, субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, равную приблизительно 4, 8, 16, 32 или 64 мг.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, подлежащую введению за один, два, три или более приемов. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, и доза гуанабенза, предпочтительно терапевтически эффективная доза, представляет собой суточную дозу, подлежащую введению за один или два приема.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбирается из группы, содержащей или включающей острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, карциному надпочечника, карциному жёлчного протока, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, гастроинтестинальные стромальные опухоли, глиобластому, раковые образования головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, Лимфому Ходжкина, рак почки, рак легких, меланому, Рак кожи из клеток Меркеля,

мезотелиому, множественную миелому, миелопролиферативные нарушения, неходжкинскую лимфому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак слюнной железы, саркому, плоскоклеточную карциному, рак яичка, рак щитовидной железы, уротелиальную карциному, и увеальную меланому.

В соответствии с одним вариантом осуществления, онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, не является гинекологическим онкологическим заболеванием или гинекологической опухолью. В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, не является раком яичников или опухолью яичников.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбирается из группы, содержащей или включающей острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, карциному надпочечника, карциному жёлчного протока, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, гастроинтестинальные стромальные опухоли, глиобластому, раковые образования головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, Лимфому Ходжкина, рак почки, рак легких, меланому, Рак кожи из клеток Меркеля, мезотелиому, множественную миелому, миелопролиферативные нарушения, неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак слюнных желез, саркому, плоскоклеточную карциному, рак яичка, рак щитовидной железы, уротелиальную карциному и увеальную меланому.

В соответствии с одним вариантом осуществления, онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой онкологию, устойчивую к противораковой иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

Примеры онкологии, устойчивой к противораковой иммунотерапии,

включают, в числе прочих, колоректальный рак, рак поджелудочной железы и рак простаты.

В соответствии с одним вариантом осуществления, субъект, страдающий онкологическим заболеванием, подлежащим лечению в соответствии с настоящим изобретением, демонстрирует устойчивость к противораковой иммунотерапии, описанной выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль.

В контексте настоящего изобретения термин «солидный рак» охватывает любые виды онкологии (также именуемой «злокачественное новообразование»), при котором формируется дискретная опухолевая масса, в противоположность видам онкологии (или злокачественного новообразования), которые диффузно инфильтрируют ткань без формирования массы.

Примеры солидного рака включают, в числе прочих, аденокарциному, карциному анального канала, базальноклеточную карциному, карциному жёлчного протока, рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, например, глиобластому или опухоли центральной нервной системы (ЦНС), рак молочной железы (например, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом и отечно-инфильтративный рак молочной железы), рак шейки матки, рак матки, рак эндометрия, колоректальный рак (КРР), например, карциному толстой кишки, рак пищевода, рак глаза, например, ретинобластому, рак жёлчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальную карциному, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО), раковые образования головы и шеи (например, рак гортани, рак ротоглотки, назофарингеальную карциному, или рак горла), рак печени, например, гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК), лимфому Ходжкина, саркому Капрши, мастоцитоз, миелофиброз, рак легких (например, карциному легкого, немелкоклеточную карциному легкого (НМККЛ), и мелкоклеточный рак легких), плевральную мезотелиому, меланому, например,

увеальную меланому, нейроэндокринные опухоли, нейробластому, рак яичников, первичный перитонеальный рак, рак поджелудочной железы, рак паращитовидной железы, рак полового члена, аденому гипофиза, рак предстательной железы, например, метастатический кастрационно-резистентный рак простаты, рак прямой кишки, рак почки, например, почечно-клеточная карцинома (ПЧК), рак кожи, кроме меланомы, например, рак кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому например, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак яичка, рак щитовидной железы и рак уретры.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранную из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание,

подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой

терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному,

карциному печени, глиобластома, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы; и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой метастатический солидный рак, *то есть*, солидный рак, при котором в дополнение к первичной опухоли наблюдается, по крайней мере, одна метастатическая опухоль.

В соответствии с одним вариантом осуществления, солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, *то есть*, солидный рак или опухоль, восприимчивые к иммунотерапии.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в

соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы,

содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с хорошей иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокортикальную карциному, саркому кожи, карциному легкого и карциному печени; и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления, солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, *то есть*, солидный рак или опухоль, невосприимчивые к иммунотерапии.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому

кожи, фибросаркому, глиобласту, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобласту, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобласту, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобласту, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную

выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобластому, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобластому, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобластому, карциному поджелудочной железы и тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой солидный рак или солидную опухоль с низкой иммуногенностью, выбранные из группы, содержащей или включающей карциному предстательной железы, саркому кожи, фибросаркому, глиобластому, карциному поджелудочной железы и

тестикулярную тератому; и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей меланому, например, увеальную меланому, рак поджелудочной железы, рак легких, например, карциному легкого или немелкоклеточный рак легких, плевральную мезотелиому, рак яичников, первичный перитонеальный рак, рак предстательной железы, например, метастатический кастрационно-резистентный рак простаты, гастроинтестинальную карциному, рак молочной железы, рак печени, например, гепатоцеллюлярную карциному, саркому, и опухоли центральной нервной системы (ЦНС). В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей меланому, например, увеальную меланому, рак поджелудочной железы, рак легких, например, карциному легкого или немелкоклеточный рак легких, плевральную мезотелиому, первичный перитонеальный рак, рак предстательной железы, например, метастатический кастрационно-резистентный рак простаты, гастроинтестинальную карциному, рак молочной железы, рак печени, например, гепатоцеллюлярную карциному, саркому, и опухоли центральной нервной системы (ЦНС).

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей меланому, рак кожи из клеток Меркеля, Лимфому Ходжкина, рак легких, раковые образования головы и шеи, рак мочевого пузыря, и рак почки.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак молочной железы, рак желудка, и глиобластому. В одном варианте

осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей рак поджелудочной железы, рак простаты, рак молочной железы, рак желудка и глиобластома.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, содержащей или включающей меланому, колоректальный рак, например, карциному толстой кишки, рак легких, раковые образования головы и шеи, и рак мочевого пузыря

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе, или вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток,

описанную выше в настоящем документе, или терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию адоптивным переносом клеток, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой терапию ингибиторами контрольных точек, описанную выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления солидный рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой меланому; и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, в частности, терапевтическую вакцинацию, описанную выше в настоящем документе.

Согласно определению, приведенному выше в настоящем документе, понятие «инфекционное заболевание», в контексте настоящего изобретения, охватывает любое заболевание, вызванное возбудителем инфекции, например, вирусом, бактерией, грибом или простейшим паразитом.

В одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание вызвано вирусом. Другими словами, в одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано вирусом, и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, например, профилактическую или терапевтическую вакцинацию.

Примеры вирусов, которые могут вызывать вирусную инфекцию, включают, в числе прочих, вирусы семейств *Arenaviridae*, *Astroviridae*, *Birnaviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Closteroviridae*,

*Comoviridae, Cystoviridae, Flaviviridae, Flexiviridae, Hepadnaviridae, Hepavirus, Herpesviridae, Leviviridae, Luteoviridae, Mononegavirales, Mosaic Viruses, Nidovirales, Nodaviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papillomaviridae, Picobirnavirus, Picornaviridae, Potyviridae, Reoviridae, Retroviridae, Sequiviridae, Tenuivirus, Togaviridae, Tombusviridae, Totiviridae, и Tymoviridae.*

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано эболавирусом, например, заирским эболавирусом.

В одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание вызвано бактерией. Другими словами, в одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано бактерией, и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, например, профилактическую или терапевтическую вакцинацию.

Примеры бактерий, которые могут вызывать бактериальную инфекцию, включают, в числе прочих, бактерий родов *Bacillus*, включая *Bacillus anthracis* и *Lactobacillus*; *Brucella*; *Bordetella*, включая *B. pertussis* и *B. bronchiseptica*; *Campylobacter*; *Chlamydia*, включая *C. psittaci* и *C. trachornatis*; *Corynebacterium*, включая *C. diphtheriae*; *Enterobacter*, включая *E. aerogenes*; *Enterococcus*; *Escherichia*, включая *E. coli*; *Flavobacterium*, включая *F. meningosepticum* и *F. odoratum*; *Gardnerella*, включая *G. vaginalis*; *Klebsiella*; *Legionella*, включая *L. pneumophila*; *Listeria*; *Mycobacterium*, включая *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, и *M. lepraerium*; *Neisseria*, включая *N. gonorrhoeae* и

*N. meningitides*; *Nocardia*; *Proteus*, включая *P. mirabilis* и *P. vulgaris*; *Pseudomonas*, включая *P. aeruginosa*; *Rickettsia*, включая *R. rickettsii*; *Serratia*, включая *S. marcescens* и *S. liquefaciens*; *Staphylococcus*; *Streptomyces*, включая *S. somaliensis*; *Streptococcus*, включая *S. pyogenes*; и *Treponema*.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой туберкулез.

В одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание вызвано грибом. Другими словами, в одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание представляет собой грибковую инфекцию.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано грибом, и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, например, профилактическую или терапевтическую вакцинацию.

Примеры грибов, которые могут вызывать бактериальную инфекцию, включают, в числе прочих, грибки родов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Epidermophyton*, *Microsporum* и *Trichophyton*.

В одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание вызвано простейшим паразитом. Другими словами, в одном варианте осуществления упомянутое инфекционное заболевание представляет собой протозойную инфекцию.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, вызвано простейшим паразитом, и иммунотерапия представляет собой вакцинацию, например, профилактическую или терапевтическую вакцинацию.

Примеры простейших паразитов, которые могут вызывать протозойную инфекцию, включают, в числе прочих, *Coccidia*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* и *Trypanosoma*.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой малярию.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фигура 1** показывает действие гуанабенза на функцию Т-клеток. CD8<sup>+</sup> Т-клетки мышей линии TCRP1A инкубировали с гуанабензом в течении 16 часов и культивировали совместно с клетками L1210-P1A-B7.1, служившими в качестве клеток-мишеней. **Фигура 1А** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которая оценивалась путем определения CD107a методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) в ходе совместного культивирования. CD8<sup>+</sup> Т-клетки мышей линии TCRP1A инкубировали с гуанабензом в течении 24 часов и культивировали совместно с клетками L1210-P1A-B7.1, служившими в качестве клеток-мишеней. Через 16 часов после совместного культивирования собирали супернатант. **Фигура 1В** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую содержание в собранном супернатанте секретированного интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), измеренное методом ELISA. Клетки клона человеческих анти-WT1 CD8<sup>+</sup> Т-клеток инкубировали с гуанабензом в течение 16 часов и культивировали совместно с клетками-мишенями, в которые вводили пептид WT1. **Фигура 1С** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую дегрануляцию человеческих CD8<sup>+</sup> Т-клеток, оцененную путем определения CD107a методом FACS. **Фигура 1D** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую секрецию интерферона гамма в супернатанте совместной ночной культуры, количественно измеренную методом ELISA (**D**).

**Фигура 2** показывает действие гуанабенза на мышей с трансплантированной опухолью T429.11. Мышам с трансплантированной опухолью T429.11 ежедневно вводили гуанабенз (5 мг/кг, инъекции интраперитонеально) или несущую среду (фосфатно-солевой буфер, инъекции интраперитонеально), начиная с дня, когда размер опухоли составлял

приблизительно  $1\ 000\ \text{мм}^3$  (день 1), до дня умерщвления (день 6). **Фигура 2А** представляет собой график, показывающий рост опухоли у мышей с трансплантированной опухолью T429.11 в период между днем 1 и днем умерщвления (день 6). **Фигура 2В** представляет собой гистограмму, на которой показана инфильтрация опухоли  $\text{CD8}^+$  Т-клетками у мышей с трансплантированной опухолью T429.11, измеренная методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) в день умерщвления (день 6).

**Фигура 3** представляет собой график, показывающий рост опухоли у мышей  $\text{TiRP}^{+/+}$ , получавших ежедневные инъекции гуанабенза (5 мг/кг, интраперитонеально) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально), начиная с дня, когда размер опухоли составлял приблизительно  $400\ \text{мм}^3$  (день 0), и до дня умерщвления (день 12).

**Фигура 4** представляет собой график, показывающий рост опухоли у мышей  $\text{Rag1}^{-/-}\text{TiRP}^{+/+}$  с иммунодефицитом, которым вводили 4-гидрокситамоксифен с целью индуцировать развитие опухоли  $\text{TiRP}$ . Когда объем опухоли достигал  $500\ \text{мм}^3$  (день 0), мышей с опухолью случайным образом распределяли по группам и ежедневно делали инъекции гуанабенза (5 мг/кг, интраперитонеально) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально) до дня умерщвления (день 15).

**Фигура 5** показывает действие гуанабенза у мышей  $\text{TiRP}$ , в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос P1A-специфичных  $\text{CD8}^+$  Т-клеток. **Фигура 5А** представляет собой график, демонстрирующий рост опухоли у мышей  $\text{TiRP}$ , которым провели адоптивный перенос клеток (АПК) путем введения 10 миллионов P1A-специфичных активированных  $\text{CD8}^+$  Т-клеток, и ежедневно делали инъекции гуанабенза (5 мг/кг, интраперитонеально) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально), начиная с дня АПК, когда размер опухоли составлял приблизительно  $500\ \text{мм}^3$  (день 0), и до дня умерщвления (день 18). **Фигура 5В** представляет собой гистограмму, на

которой показана масса опухоли у мышей TiRP, измеренная в день умерщвления (день 18). Оценка инфильтрации опухоли P1A-специфичными CD8<sup>+</sup> клетками проводилась методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток через 10 дней после АПК. **Фигура 5C** представляет собой гистограмму, на которой показана инфильтрация опухоли P1A-специфичными CD8<sup>+</sup> клетками, выраженная в виде процентной доли P1A-тетрамер-положительных CD8<sup>+</sup> Т-клеток от общего числа живых клеток в микросреде опухоли. **Фигура 5D** представляет собой гистограмму, на которой показана инфильтрация опухоли P1A-специфичными CD8<sup>+</sup> клетками, выраженная в виде процентной доли P1A-тетрамер-положительных клеток от общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **Фигура 5E** представляет собой гистограмму, на которой показаны результаты анализа апоптоза P1A-специфичных инфильтрирующих опухоль CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, проведенного методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) через 10 дней после АПК. **Фигура 5F** представляет собой гистограмму, на которой показаны результаты анализа маркера активации Т-клеток CD69 в P1A-специфичных инфильтрирующих опухоль CD8<sup>+</sup>Т-клетках, проведенного методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) через 10 дней после АПК.

**Фигура 6** представляет собой гистограмму, на которой показаны результаты оценки инфильтрации опухоли P1A-специфичными CD8<sup>+</sup>Т-клетками, проведенной методом FACS через 4 дня после адоптивного переноса TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клеток у мышей, получавших гуанабенз (5 мг/кг, интраперитонеально) или несущую среду (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально).

**Фигура 7** показывает действие гуанабенза в модели иммунизации мышей с использованием вакцины, содержащей облученные клетки L1210-P1A-B7.1. Мыши линии DBA/2 получали либо только вакцину, содержащую 10<sup>6</sup> облученных клеток L1210-P1A-B7.1 (иммунизация), либо вакцину совместно с 100 мкг (5 мг/кг) гуанабенза (иммунизация + гуанабенз). Мыши, не

проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля (контроль). Через неделю после проведения иммунизации брали селезенку и выделяли спленоциты. Затем спленоциты стимулировали *in vitro* течение четырех дней клетками L1210-P1A-B7.1 в соотношении 1:1 с целью экспансии P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **Фигура 7А** представляет собой гистограмму, на которой показана процентная доля P1A-антигенспецифичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток от общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток; оценка проводилась методом окрашивания тетрамером P1A, конъюгированным с фикоэритрином (PE), и антителами к CD8, конъюгированными с аллофикоцианином (APC), через четыре дня после стимуляции. После четырехдневной стимуляции *in vitro* спленоциты повторно стимулировали клетками L1210-P1A-B7.1 в соотношении 1:1 в течение ночи. **Фигура 7В** представляет собой гистограмму, показывающую измеренное методом ELISA количество интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), секретированного спленоцитами.

**Фигура 8** показывает действие гуанабенза в модели иммунизации мышей овалбумином. Мышей линии C57BL/6J однократно иммунизировали путем интраперитонеальной инъекции 200 мкг протеина OVA, адсорбированного на адьюванте Alhydrogel 2% (Sigma). За два часа до иммунизации и ежедневно после иммунизации мышам вводили 100 мкг гуанабенза (гуанабенз). Мыши, не проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля (контроль). Через неделю после иммунизации брали кровь и селезенку иммунизированных мышей, и клетки крови и селезенки культивировали в присутствии пептида OVA концентрацией 10 мкмоль/л. **Фигура 8А** представляет собой гистограмму, демонстрирующую иммунный ответ, оценка которого осуществлялась путем определения процентной доли CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма (IFN $\gamma$ ), от общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток в клеточных культурах, полученных из крови иммунизированных мышей. **Фигура 8В** представляет собой гистограмму, демонстрирующую иммунный ответ, оценка которого осуществлялась путем

определения процентной доли CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма (IFN $\gamma$ ), от общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток в клеточных культурах, полученных из селезенки иммунизированных мышей.

**Фигура 9** представляет собой график, показывающий рост опухоли у мышей с трансплантированной меланомой B16F10, которые получали только гуанабенз, только анти-PD-1, или гуанабенз и анти-PD-1. Таким образом, мыши получали ежедневно инъекцию гуанабенза (2,5 мг/кг, интраперитонеально) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально) в течение 7 дней после инокуляции опухоли и до умерщвления. Кроме того, мыши получали 4 инъекции (интраперитонеально) антител к PD-1 (BioXcell, клон RMP1-14, 200 мкг/мышь) или изотипа (контроль) с 3-дневными интервалами, начиная с дня, следующего за днем введения гуанабенза или несущей среды. Размер опухоли отслеживали ежедневно.

**Фигура 10** представляет собой гистограмму, демонстрирующую действие гуанабенза на функцию NK-клеток. Мышиные естественные клетки-киллеры (NK-клетки) выделяли из спленоцитов мышей TiRP 10B с использованием магнитных микрогранул, покрытых антителами к CD49b. Выделенные NK-клетки активировали при помощи клеток RMA-S. Через 4 дня после активирования NK-клетки собирали и обрабатывали гуанабензом концентрацией 20 мкмоль/л в течение 16 часов. Обработанные NK-клетки затем культивировали совместно с клетками RMA-S в качестве клеток-мишеней. Дегрануляцию NK-клеток оценивали посредством обнаружения CD107a методом FACS в ходе совместного культивирования.

**Фигура 11** содержит оценку действия алпренолола на функцию Т-клеток и в сочетании с адоптивным переносом клеток. **Фигура 11А** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую действие алпренолола на функцию Т-клеток. Мышиные TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки инкубировали с алпренололом концентрацией 5 мкМ или 20 мкМ, как указано, в течение 16 часов. Обработанные Т-клетки затем культивировали совместно с клетками

L1210-P1A-B7.1 в качестве клеток-мишеней. Дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали посредством обнаружения CD107a методом FACS в ходе совместного культивирования. **Фигуры 11В и 11С** иллюстрируют действие алпренолола у мышей TiRP, в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **Фигура 11В** представляет собой график, отражающий рост опухоли у мышей TiRP, в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос клеток (АПК) путем введения 10 миллионов P1A-специфичных активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и которые ежедневно получали инъекции алпренолола (5 мг/кг, и.п.) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, и.п.), начиная с дня АПК, когда размер опухоли составлял примерно 500 мм<sup>3</sup> (день 0), до дня умерщвления (день 10). **Фигура 11С** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую инфильтрацию опухоли P1A-специфичными клетками CD8<sup>+</sup>. Оценка инфильтрации проводилась методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) через 7 дней после АПК. Инфильтрация опухоли P1A-специфичными клетками CD8<sup>+</sup> выражена в виде процентной доли P1A-тетрамер-положительных CD8<sup>+</sup> Т-клеток от общего числа клеток CD45<sup>+</sup> в микросреде опухоли; “нз” означает «незначимо».

**Фигура 12** содержит оценку действия сунитиниба на функцию Т-клеток и в сочетании с адоптивным переносом клеток. **Фигура 12А** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую действие сунитиниба на функцию Т-клеток. Мышиные TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки инкубировали с гуанабензом концентрацией 20 мкМ или с различными концентрациями сунитиниба, как указано, в течение 16 часов. Обработанные Т-клетки затем культивировали совместно с клетками L1210-P1A-B7.1 в качестве клеток-мишеней. Дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали посредством обнаружения CD107a методом FACS в ходе совместного культивирования. **Фигуры 12В и 12С** иллюстрируют действие сунитиниба у мышей TiRP, в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **Фигура**

**12В** представляет собой график, отражающий рост опухоли у мышей TiRP, в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос клеток (АПК) путем введения 10 миллионов P1A-специфичных активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и которые ежедневно получали сунитиниб (20 мг/кг) или несущую среду (фосфатно-солевой буфер) через желудочный зонд, начиная с дня АПК, когда размер опухоли составлял примерно 500 мм<sup>3</sup> (день 0), до дня умерщвления (день 10). **Фигура 12С** представляет собой гистограмму, иллюстрирующую действие сунитиниба у мышей TiRP, в отношении которых осуществлялся адоптивный перенос P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Мышам в группе, получавшей сунитиниб, ежедневно вводили сунитиниб через желудочный зонд в дозе, составляющей 20 мг/кг. Инфильтрация опухоли P1A-специфичными клетками CD8<sup>+</sup> выражена в виде процентной доли P1A-тетрамер-положительных CD8<sup>+</sup> Т-клеток от общего числа живых клеток в микросреде опухоли; “нз” означает «незначимо».

## **ПРИМЕРЫ**

Настоящее изобретение иллюстрируют также следующие примеры.

Пример 1.

### ***Материалы и методы***

#### ***Материалы***

#### **Мыши**

**Мыши TiRP:** мыши TiRP были получены скрещиванием мышей Ink4a/Arf<sup>flox/flox</sup> с мышами, несущими трансгенную конструкцию, контролируемую промотором тирозиназы и инициирующую экспрессию H-Ras<sup>12V</sup> и Trp1a, который кодирует P1A, являющийся опухолевым антигеном MAGE-типа; указанный промотор отделен от кодирующего участка стоп-касsetой, состоящей из самоудаляющейся рекомбиназы CreER, фланкированной сайтами loxP (Huijbers и другие авторы, 2006, Cancer Res 66, 3278-3286). Этим мышам подвергали обратному скрещиванию с генетическим

фоном B10.D2 и доводили до гомозиготности. У мышей TCRP1A, гетерозиготных по H-2Ld/P1A35-43-специфическому TCR-трангену, поддерживали фон B10.D2;Rag1<sup>-/-</sup> (Shanker и другие авторы, 2004, J Immunol 172, 5069-5077). Все мыши, участвовавшие в исследовании, были получены в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF) в виварии Института Людвиг по исследованию рака. Все правила, касающиеся условий содержания животных, были соблюдены в соответствии с директивой ЕС 2010/63/EU. Все процедуры производились с одобрения местного Комитета по контролю этических норм обращения с животными, со ссылкой на 2015/UCL/MD/15.

*Модель TiRP-производной трансплантированной меланомы T429.11:* клон T429.11 является производным индуцированной опухоли Amela TiRP, обозначенной как T429. Он был клонирован из линии клеток индуцированной первичной меланомы T429. Для получения опухоли мышам-реципиентам подкожно вводилось два миллиона опухолевых клеток T429.11 (Zhu и другие авторы, Nat Commun. 2017, 10;8(1):1404).

#### Клетки

*Мышиные TCRP1A CD8<sup>+</sup> T-клетки:* P1A-специфические (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> T-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов мышей TCRP1A с использованием микрогранул anti-mouse CD8 $\alpha$  (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec).

*Человеческие анти-WT1 CD8<sup>+</sup> T-клетки:* конструкцию кДНК, кодирующую рекомбинантный TCR против пептида WT1 126-134, презентруемый HLA A2, вводили в мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), взятые у пациента с гемохроматозом, затем TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-клетки сортировали и клонировали, используя тетрамер WT1<sub>126-134</sub> HLA2. Далее T-клетки культивировали с использованием облученных T2-клеток, в которые вводили пептид WT1<sub>126-134</sub>, и облученных аллогенных клеток EBVB в присутствии IL2 (100 ЕД/мл).

## *Методы*

### Функция Т-клеток *in vitro*

*Проба на цитотоксичность с использованием CD107 (анализ дегрануляции):* TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки помещали на U-образный 96-луночный планшет из расчета 50 000 клеток на лунку, с различными концентрациями гуанабенза, и инкубировали при 37 С° в течение ночи перед проведением пробы на следующий день. В день проведения анализа супернатант клеточной культуры удаляли, и клетки один раз промывали полной средой, чтобы удалить препарат. Клетки-мишени L1210-P1A-B7.1 добавляли в лунки в соотношении 1:1. На каждом планшете также имелись контрольные лунки, содержащие только Т-клетки или только клетки-мишени. Одновременно с клетками-мишенями в каждую лунку добавляли CD107a-APC. Затем планшет инкубировали при 37С° в течение 90 минут. По окончании времени инкубации клетки собирали и один раз промывали фосфатно-солевым буфером. В течение 15 минут их метили антимышиными антителами CD8-Bv421. Затем клетки промывали, ресуспендировали в фосфатно-солевым буфере и анализировали с помощью проточного цитометра FACS Fortessa. Аналогичным образом оценивалась дегрануляция человеческих CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Для индуцирования дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в качестве клеток-мишеней использовали Т2-клетки, несущие синтетический пептид WT1<sub>126-134</sub> (10<sup>6</sup> Т2-клеток инкубировали в течение 1 часа в 200 мкл среды Optimem с синтетическим пептидом в концентрации 100 мкмоль/л при 37°С).

*Анализ секреции интерферона гамма:* CD8<sup>+</sup> Т-клетки помещали на U-образный 96-луночный планшет из расчета 50 000 клеток на лунку, с различными концентрациями гуанабенза в полной среде с добавлением IL2, и инкубировали при 37 С° в течение ночи перед их использованием для проведения анализа на следующий день. В день проведения анализа

супернатант клеточной культуры удаляли, и клетки один раз промывали полной средой, чтобы полностью удалить препарат. Клетки-мишени L1210-P1A-B7.1 или T2-клетки, несущие пептид WT1<sub>126-134</sub>, добавляли в лунки в соотношении 1:1. На каждом планшете также имелись контрольные лунки, содержащие только T-клетки или только эффекторные клетки. Далее планшет инкубировали при 37 С° в течение ночи. По окончании времени инкубации собирали супернатант и измеряли содержание интерферона гамма методом ELISA в соответствии с инструкцией производителя (R&D).

#### Индукция роста опухоли 4-гидрокситамоксифеном

Готовили свежий раствор 4-гидрокситамоксифена путем растворения 4-гидрокситамоксифена (Imaginechem) в 100% этаноле и минеральном масле (соотношение 1:9) с последующей 30-минутной соникацией, и вводили подкожно (2 мг/200 мкл каждой мышши) в область шеи 7-недельным мышам TiRP с соблюдением соответствия по полу. Образование опухоли отслеживали ежедневно; измерение опухоли проводили трижды в неделю. Объем опухоли (в мм<sup>3</sup>) вычисляли по следующей формуле: Объем = ширина<sup>2</sup> x длина/2. Мышей TiRP с опухолью случайным образом распределяли по группам, исходя из размера опухоли, когда средний объем составлял 400 мм<sup>3</sup>, 500 мм<sup>3</sup> или 1000 мм<sup>3</sup>, как указано.

#### Введение гуанабенза

T-клетки инкубировали с гуанабензом (10, 20 или 40 мкмоль/л) в течение 16 часов или 24 часов, как указано.

Мышам проводили ежедневно интраперитонеальную инъекцию гуанабенза (5 мг/кг) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер), начиная с дня случайного распределения по группам (и дня адоптивного переноса клеток, когда это применимо), до дня умерщвления.

#### Адоптивный перенос клеток с участием TCRP1A CD8<sup>+</sup> T-клеток

Для осуществления адоптивного переноса клеток (АПК), P1A-специфичные (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> T-клетки выделяли из селезенки и

лимфатических узлов мышей TCRP1A, как описано выше в настоящем документе, и стимулировали *in vitro* путем совместного культивирования с облученными (10 000 рад) клетками L1210-P1A-B7.1 (Gajewski и другие авторы, 1995, J Immunol 154, 5637-5648) в соотношении 1:2 ( $0,5 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> Т-клеток и  $10^5$  клеток L1210-P1A-B7.1 на лунку 48-луночного планшета) в среде Дульбекко в модификации Искова (GIBCO), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с добавлением L-аргинина (0,55 ммоль/л, Merck), L-аспарагина (0,24 ммоль/л, Merck), глутамина (1,5 ммоль/л, Merck), бета-меркаптоэтанола (50 мкмоль/л, Sigma), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Через четыре дня TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки очищали методом градиента плотности с использованием среды Lymphoprep (StemCell), и  $10^7$  живых клеток вводили внутривенно в 200 мкл фосфатно-солевого буфера мышам, несущим опухоль TiRP, в день случайного распределения по группам.

### **Результаты**

#### *Влияние гуанабенза на функцию Т-клеток in vitro*

Мышиные P1A-специфичные (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые культивировали совместно с клетками L1210-P1A, экспрессирующими антиген P1A, инкубировали с гуанабензом в течение 16 часов. Активность Т-клеток после распознавания антигена оценивалась посредством определения дегрануляции и секреции интерферона гамма (IFN $\gamma$ ). Как показано на **Фигурах 1А-В**, инкубирование Т-клеток с гуанабензом привело к повышению дегрануляции Т-клеток (**Фигура 1А**) и к увеличению секреции интерферона гамма (**Фигура 1В**). Сходные результаты были получены для человеческих анти-WT1 CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые культивировали совместно с клетками-мишенями, несущими введенный в них пептид WT1, и инкубировали с гуанабензом (**Фигуры 1С-Д**). Результаты, показанные на **Фигуре 1**, таким образом, демонстрируют способность гуанабенза усиливать функцию Т-клеток *in vitro*.

*Результаты, полученные для модели TiRP-производной трансплантированной меланомы T429.11 in vivo*

Ранее было продемонстрировано, что модель трансплантированной меланомы T429.11 не реагирует на анти-PD-1- и анти-CTLA4-терапию (Zhu и другие авторы, Nature communications. Nov 10 2017;8(1):1404). Мышам с трансплантированной опухолью T429.11 ежедневно делали инъекцию гуанабенза (5 мг/кг, интраперитонеально) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально), начиная с дня, в который размер опухоли составлял приблизительно 1000 мм<sup>3</sup> (день 1), до дня умерщвления (день 6). Как показано на **Фигуре 2А**, гуанпбенз подавлял рост опухоли, даже несмотря на то, что введение гуанабенза началось на поздней стадии (опухоль размером 1000 мм<sup>3</sup>) и в отсутствие анти-PD-1- и анти-CTLA4-терапии. Как показано на **Фигуре 2В**, снижение темпов роста опухоли сопровождалось увеличением инфильтрации опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

*Эффекты в модели меланомы TiRP*

TiRP представляет собой модель меланомы у мышей, полученную методами генной инженерии, в основе которой лежит регулируемая тамоксифеном и опосредованная ферментом Cre экспрессия H-Ras<sup>G12V</sup> и делеция Ink4A/Arf в меланоцитах, параллельно с экспрессией специфического опухолево антигена MAGE-типа, названного P1A. Для модели TiRP характерны локально агрессивные опухоли, невосприимчивые к таким видам иммунотерапии, как, например, адоптивный перенос клеток (АПК). В частности, модель TiRP не реагирует на адоптивный перенос активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных в отношении антигена P1A (TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки). Отсутствие ответа объясняется тем фактом, что перенесенные TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки подвергаются апоптозу и исчезают из опухоли через несколько дней. Одним из главных факторов, ответственных за иммунорезистентность опухолей TiRP, является высокое содержание в опухоли полиморфноядерных супрессорных клеток миелоидного происхождения (PMN-MDSC), способных

вызывать апоптоз инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), например, инфильтрирующих опухоль TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клеток, посредством взаимодействия Fas/Fas-лиганд (Zhu и другие авторы, Nature communications. Nov 10. 2017; 8(1):1404).

Мышам с опухолью TiRP делали инъекции гуанабенза ежедневно, начиная с дня, когда размер опухоли составлял приблизительно 400 мм<sup>3</sup>, до дня умерщвления. Как показано на **Фигуре 3**, гуанабенз оказывал ингибиторное действие на рост опухоли TiRP, предположительно, за счет усиления эндогенного противоопухолевого иммунного ответа.

Для контроля, возникновение опухолей индуцировали у иммунодефицитных мышей TiRP, у которых отсутствовали Т-клетки вследствие делеции гена Rag1 (мыши Rag 1<sup>-/-</sup> TiRP<sup>+/+</sup>). Когда объем опухоли достигал приблизительно 500 мм<sup>3</sup>, мышам с опухолью TiRP начинали делать ежедневные инъекции гуанабенза вплоть до дня умерщвления. Примечательно, что гуанабенз терял эффективность и не индуцировал снижение роста опухоли TiRP по сравнению с контрольной группой (**Фигура 4**). Таким образом, данный результат подтверждает, что ингибиторное действие гуанабенза на рост опухоли является иммунно-опосредованным.

Кроме того, мышам с опухолью TiRP вводили гуанабенз и 10 миллионов P1A-специфичных активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в рамках процедуры адоптивного переноса клеток (АПК). Ежедневные инъекции гуанабенза проводили, таким образом, начиная с дня АПК, когда объем опухоли достигал приблизительно 500 мм<sup>3</sup>, до дня умерщвления. Как показано на **Фигуре 5**, гуанабенз значительно повышал чувствительность иммунорезистентных автохтонных меланом (TiRP) к адоптивному переносу клеток (АПК). По состоянию на день умерщвления наблюдалось существенное уменьшение как опухолевого роста (**Фигура 5А**), так и веса опухоли (**Фигура 5В**) при применении гуанабенза совместно с АПК по сравнению с применением только АПК. После введения гуанабенза возрастала инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-

клетками (**Фигуры 5C-D**) и уменьшался апоптоз перенесенных в рамках АПК CD8<sup>+</sup> Т-клеток (**Фигура 5E**). Более того, инфильтрирующие опухоль CD8<sup>+</sup> Т-клетки демонстрировали бóльшую активность у мышей, получавших гуанабенз, что следует из повышения процентного содержания CD69<sup>+</sup> P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток (**Фигура 5F**). Данные результаты показывают, что гуанабенз повышает терапевтическую эффективность адоптивного переноса клеток.

В предшествующих экспериментах, перед осуществлением АПК мышам с опухолью TiRP, P1A-специфичные CD8<sup>+</sup> Т-клетки предварительно активировали *in vitro* путем совместного культивирования с облученными клетками L1210-P1A-B7.1, как описано выше в настоящем документе. Действительно, предшествующие исследования показали, что при переносе мышам с опухолью TiRP неактивированных TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клеток упомянутые неактивированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки не приммируются надлежащим образом (Soudja и другие авторы, Cancer research. May 1 2010; 70(9):3515-3525). Мышам с опухолью TiRP проводили перенос 2 миллионов неактивированных P1A-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в рамках процедуры АПК и осуществляли введение гуанабенза в виде ежедневных инъекций, начиная с дня АПК. Как показано на **Фигуре 6**, у мышей TiRP, получавших гуанабенз, инфильтрация опухоли P1A-специфичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками через 4 дня после АПК была значительно выше по сравнению с контролем. Таким образом, когда мышам вводили гуанабенз, перенесенные неактивированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки приммировались надлежащим образом и заселяли опухоль. Эти данные позволяют предположить, что гуанабенз может действовать в качестве отдельного иммунотерапевтического средства, подобно ингибиторам иммунных контрольных точек, которое отключает иммуоингибирующее действие и восстанавливает противоопухолевую функцию Т-клеток.

Пример 2

**Материалы и методы**

*Материалы*

## Мыши

В экспериментах по иммунизации использовались мыши линий DBA/2 и C57BL/6J.

## *Методы*

### Иммунизация

*Иммунизация облученными опухолевыми клетками L1210-P1A-B7.1:* мыши DBA/2 получали либо только вакцину, включавшую 1 миллион облученных клеток L1210-P1A-B7.1, экспрессирующих антиген P1A, либо вакцину в сочетании со 100 мкг (5 мг/кг) гуанабенза. Гуанабенз вводили за 1 час до иммунизации и ежедневно после иммунизации. Мыши, не проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля.

*Иммунизация овалбумином:* мышей C57BL/6J иммунизировали однократно путем интраперитонеальной (и.п.) инъекции 200 мкг пептида OVA, адсорбированного на адьюванте Alhydrogel 2% (Sigma). Данной группе мышей вводили 100 мкг (5 мг/кг) гуанабенза за два часа до иммунизации и ежедневно после иммунизации. Мыши, не проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля.

### Оценка иммунного ответа

*Внутриклеточное окрашивание на интерферон гамма:* через неделю после иммунизации брали кровь и селезенку каждой мыши. Клетки селезенки и крови каждой иммунизированной мыши культивировали в течение 1 часа на 96-луночных планшетах с U-образным дном при 37 C° в присутствии пептида OVA концентрацией 10 мкмоль/л. В каждую лунку добавляли брефелдин А (10 мкг/мл) и клетки инкубировали в течение еще 4 часов. Иммунный ответ для каждой мыши оценивался путем измерения количества продуцирующих интерферон гамма (IFN $\gamma$ ) CD8<sup>+</sup> Т-клеток с использованием антител к CD8 и IFN $\gamma$ . Образцы исследовали методом проточной цитометрии (FACS Fortessa).

*Тетрамерное окрашивание:* через неделю после иммунизации брали селезенку каждой мыши. Изолированные спленоциты иммунизированных

мышей культивировали и повторно стимулировали клетками L1210-P1A-B7.1 в соотношении 1:1. Через четыре дня после повторной стимуляции, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, специфичные в отношении антигена P1A, окрашивали тетрамером P1A, конъюгированным с фикоэритрином (PE), и конъюгированными с аллофикоцианином (APC) антителами к CD8.

*Секреция интерферона гамма:* через неделю после иммунизации брали селезенку каждой мыши. Спленоциты иммунизированных мышей повторно стимулировали клетками L1210-P1A-B7.1 в соотношении 1:1. Через четыре дня после повторной стимуляции спленоциты собирали и помещали на 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 50 000 клеток на лунку. В каждую лунку добавляли клетки L1210-P1A-B7.1 в качестве клеток-мишеней в соотношении 1:1. Далее планшет инкубировали при 37 С° в течение ночи. По окончании инкубирования собирали клеточный супернатант и измеряли количество секретированного IFN $\gamma$  методом ELISA в соответствии с инструкцией производителя (R&D).

### ***Результаты***

Мышей линии DBA/2 иммунизировали либо только вакциной, содержащей 10<sup>6</sup> облученных клеток L1210-P1A-B7.1 (лейкозные клетки L1210, экспрессирующие P1A и B7-1), либо вакциной в сочетании со 100 мкг (5 мг/кг) гуанабенза. Гуанабенз вводили за 1 час до вакцины и ежедневно после иммунизации. Мыши, не проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля.

Через неделю после иммунизации мышей умерщвляли и забирали селезенку. Изолированные спленоциты повторно стимулировали клетками L1210-P1A-B7.1 в соотношении 1:1. Через четыре дня после повторной стимуляции, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, специфичные в отношении антигена P1A, окрашивали тетрамером P1A, конъюгированным с фикоэритрином (PE), и конъюгированными с аллофикоцианином (APC) антителами к CD8. Процентную долю CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных в отношении антигена P1A, от

общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культуре спленоцитов определяли, таким образом, после повторной стимуляции антигеном Р1А. Как показано на **Фигуре 7А**, наблюдалось значительное увеличение процентного содержания CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных в отношении антигена Р1А, после повторной стимуляции антигеном Р1А, при введении гуанабенза с вакциной по сравнению с отрицательным контролем (*то есть*, неиммунизированными мышами), а также по сравнению с введением только вакцины (*без гуанабенза*). В контексте иммунизации против Р1А, введение гуанабенза, таким образом, приводило к росту числа Р1А-антигенспецифичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Далее наличие иммунного ответа подтверждали посредством оценки секреции интерферона гамма CD8<sup>+</sup> Т-клетками, полученными из селезенки. Изолированные спленоциты помещали на 96-луночный U-образный планшет из расчета 50 000 клеток на лунку. В каждую лунку добавляли клетки L1210-Р1А-В7.1 в качестве клеток-мишеней в соотношении 1:1. Затем планшет инкубировали при 37 С° в течение ночи. По окончании инкубирования собирали клеточный супернатант и измеряли количество секретированного IFN $\gamma$  методом ELISA. Как показано на **Фигуре 7В**, наблюдалось значительное увеличение секреции IFN $\gamma$  в спленоцитах после их активирования клетками L1210-Р1А-В7.1 при введении гуанабенза с вакциной по сравнению с отрицательным контролем (*то есть*, неиммунизированными мышами), а также по сравнению с введением только вакцины (*без гуанабенза*). В контексте иммунизации против Р1А, введение гуанабенза, таким образом, приводило к усилению функции спленоцитов, активированных присутствием Р1А.

В общем итоге приведенные результаты показывают, что в модели иммунизации мышей с использованием вакцины, содержащей 10<sup>6</sup> облученных клеток L1210-Р1А-В7.1, гуанабенз действует в качестве адьюванта, усиливая клеточный иммунный ответ против Р1А, в значительной мере, путем индуцирования роста числа Р1А-антигенспецифичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и путем усиления функции спленоцитов, активированных в присутствии Р1А.

Влияние гуанабенза как адъюванта также оценивалось на модели иммунизации овальбумином у мышей (**Фигура 8**). Мышей линии C57BL/6J иммунизировали однократно путем интраперитонеальной (и.п.) инъекции 200 мкг протеина OVA, адсорбированного на адъюванте Alhydrogel 2% (Sigma). Данной группе мышей вводили 100 мкг (5 мг/кг) гуанабенза за два часа до иммунизации и ежедневно после иммунизации. Мыши, не проходившие иммунизацию, были включены в группу отрицательного контроля. Через неделю после иммунизации брали кровь и селезенку каждой мыши. Иммунный ответ изучали, оценивая процентную долю CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма, от общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах клеток крови (**Фигура 8А**) или селезенки (**Фигура 8В**) мышей. Как показано на **Фигуре 8**, наблюдалось значительное увеличение процентного содержания CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма, после их активирования пептидом OVA при введении гуанабенза с вакциной по сравнению с отрицательным контролем (*то есть*, неиммунизированными мышами). Данные результаты показывают, таким образом, что в модели иммунизации овальбумином гуанабенз действует в качестве адъюванта, усиливая клеточный иммунный ответ против овальбумина, в значительной мере, путем стимулирования функции Т-клеток.

### Пример 3

#### *Материалы и методы*

##### *Материалы*

##### Мыши

Мыши CD57BL/6 дикого типа с соответствием по полу и возрасту использовались в модели трансплантированной меланомы B16F10.

##### *Методы*

##### Индукция развития опухоли и средства, вводимые мышам

7-9 недельным мышам дикого типа линии CD57BL/6, с соблюдением

соответствия по полу подкожно вводили 1 миллион опухолевых клеток B16F10. Мышей распределяли по группам случайным образом на основании размера опухоли через неделю после инъекции опухолевых клеток. Через 7 дней после инокуляции мышам начинали ежедневно вводить гуанабенз (2,5 мг/кг, интраперитонеально) или несущую среду (фосфатно-солевой буфер, интраперитонеально). Мыши получали также 4 инъекции (интраперитонеально, другое обозначение - и.п.) дозы антител к PD-1 (BioXcell, клон RMP1-14) или изотипа RatIgG2a (клон 2A3, Bio-X-Cell) в размере 200 мкг на каждую мышь, с 3-дневными интервалами, первая доза вводилась через 1 день после введения гуанабенза или несущей среды.

### *Результаты*

Влияние на рост опухоли гуанабенза в сочетании с ингибитором PD-1 оценивалось у мышей с трансплантированной меланомой B16F10.

Как показано на **Фигуре 9**, по сравнению с контрольной группой (введение фосфатно-солевого буфера и изотипа) введение только антител к PD-1 не оказывало значительного влияния на рост меланом B16F10, тогда как введение только гуанабенза значительно снижало рост опухолей B16F10.

Примечательно, что комбинированное введение гуанабенза и антител к PD-1 вызвало значительное снижение роста меланом B16F10 по сравнению с контрольной группой (введение фосфатно-солевого буфера и изотипа), по сравнению с введением только антител к PD-1, а также по сравнению с введением только гуанабенза. Таким образом, эффект от введения гуанабенза в сочетании с антителами к PD-1 был значительно выше, чем эффекты от введения только гуанабенза и только антител к PD-1.

Данные результаты показывают, что гуанабенз и антитела к PD-1 действовали синергично, снижая рост меланом B16F10, при этом гуанабенз усиливал действие антител к PD-1. Данные результаты показывают, что гуанабенз способен увеличивать терапевтическую эффективность ингибитора контрольных точек иммунного ответа.

#### Пример 4

##### ***Материалы и методы***

##### *Материалы*

##### Клетки

*Мышиные естественные клетки-киллеры (NK-клетки)*: мышиные NK-клетки были выделены из спленоцитов мышей при помощи магнитных микрогранул, покрытых антителами к CD49b.

##### *Методы*

##### Функция NK-клеток *in vitro*

##### ***Результаты***

##### *Влияние гуанабенза на функцию NK-клеток *in vitro**

Мышиные NK-клетки выделяли из селезенки мышей и активировали *in vitro* путем совместного инкубирования с облученными клетками RMA-S. Через четыре дня после активирования NK-клетки инкубировали с гуанабензом (20 мкМ) при 37 С° в течение 16 часов. Функция NK-клеток оценивалась посредством определения дегрануляции после совместного культивирования NK-клеток с клетками-мишенями (клетки RMA-S). Как показано на **Фигуре 10**, инкубирование мышиных NK-клеток с гуанабензом значительно увеличивало дегрануляцию NK-клеток. Результаты, представленные на **Фигуре 10**, демонстрируют, таким образом, что гуанабенз способен усиливать функцию NK-клеток *in vitro*.

#### Пример 5

С использованием тех же моделей, которые применялись для оценки влияния гуанабенза, была проведена оценка влияния алпренолола и сунитиниба.

Алпренолол является антагонистом бета-адренергических рецепторов; используется в качестве гипотензивного, антиангинального и противоаритмического средства.

Сунитиниб представляет собой небольшую молекулу и является ингибитором рецептора тирозинкиназы (РТК). Считается, что он способен действовать в качестве адъюванта при проведении опосредованной Т-клетками иммунотерапии онкологических заболеваний (Kujawski и другие авторы, Cancer Res. 2010 Dec 1;70(23):9599-610).

### ***Материалы и методы***

#### ***Материалы***

#### **Мыши**

*Мыши TiRP*: мыши TiRP получены, как описано выше в настоящем документе (см. Пример 1).

#### **Клетки**

*Мышиные TCRP1A CD8<sup>+</sup> Т-клетки*: P1A-специфичные (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> Т-клетки были выделены, как описано выше в настоящем документе (см. Пример 1).

#### ***Методы***

#### **Функция Т-клеток *in vitro***

*Проба на цитотоксичность с использованием CD107 (анализ дегрануляции)*: проба проводилась, как описано выше в настоящем документе (см. Пример 1), с гуанабензом концентрацией 20 мкмоль/л или с различными концентрациями алпренолола или сунитиниба, как указано.

#### **Введение гуанабенза**

Т-клетки инкубировали с гуанабензом (20 мкМ) в течение 16 часов, как указано.

#### **Введение алпренолола**

Т-клетки инкубировали с алпренололом (5 или 20 мкМ) в течение 16 часов, как указано.

Мышам ежедневно вводили путем интраперитонеальных инъекций алпренолол (5 мг/кг) или несущую среду (фосфатно-солевой буфер), начиная со

дня проведения АПК и до дня умерщвления.

### Введение сунитиниба

Т-клетки инкубировали с сунитинибом (0,1; 0,3; 0,8; 2,5 или 4 мкМ) в течение 16 часов, как указано.

Мыши получали ежедневную дозу сунитиниба (20 мг/кг) или несущей среды (фосфатно-солевой буфер) через желудочный зонд, начиная с дня проведения АПК и до дня умерщвления.

### **Результаты**

#### *Влияние алпренолола на функцию Т-клеток in vitro*

Мышиные Р1А-специфичные (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые культивировали совместно с клетками L1210-P1A, экспрессирующими антиген Р1А, инкубировали с алпренололом концентрацией 5 мкМ или 20 мкМ в течение 16 часов. Функция Т-клеток после распознавания антигена оценивалась посредством определения дегрануляции. Как показано на **Фигуре 11А**, инкубирование мышиных Т-клеток с алпренололом не вызывало существенного увеличения дегрануляции Т-клеток по сравнению с контрольной группой (введение фосфатно-солевого буфера).

Таким образом, представляется, что, в противоположность тому, что наблюдалось в случае гуанабенза, (см. **Фигуру 1**), алпренолол не способен усиливать функцию Т-клеток *in vitro*, как в концентрации 5 мкмоль/л, так и в концентрации 20 мкмоль/л.

#### *Действие алпренолола in vivo в рамках модели меланомы TiRP*

Мышам с опухолью TiRP, полученным как описано выше в настоящем документе (см. Пример 1), вводили алпренолол и осуществляли адоптивный перенос клеток (АПК) введением 10 миллионов Р1А-специфичных активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Ежедневные инъекции алпренолола (5 мг/кг; интраперитонеально или, кратко, и.п.) проводили, таким образом, начиная с дня АПК (день 0), когда размер опухоли составлял приблизительно 500 мм<sup>3</sup>, до дня умерщвления (день 10). Как показано на **Фигуре 11В**, не наблюдалось

значительного снижения роста опухоли при осуществлении АПК совместно с введением алпренолола по сравнению с только АПК (контрольная группа, соответствующая введению фосфатно-солевого буфера). Соответственно образом, после введения алпренолола не повышалась инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками (**Фигура 11С**). Данные результаты показывают, что алпренолол не увеличивает терапевтическую эффективность адоптивного переноса клеток, в противоположность результатам, наблюдавшимся в случае гуанабенза (см. **Фигуру 5**).

*Влияние сунитиниба на функцию Т-клеток in vitro*

Мышиные P1A-специфичные (TCRP1A) CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые культивировали совместно с клетками L1210-P1A, экспрессирующими антиген P1A, инкубировали с гуанабензом концентрацией 20 мкМ или сунитинибом (0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 0,8 мкМ, 2,5 мкМ или 4 мкМ) в течение 16 часов. Функция Т-клеток после распознавания антигена оценивалась посредством определения дегрануляции. Как показано на **Фигуре 12А**, инкубирование мышиных Т-клеток с сунитинибом не вызывало существенного увеличения дегрануляции Т-клеток по сравнению с контрольной группой (введение фосфатно-солевого буфера). В противоположность этому, инкубирование мышиных Т-клеток с гуанабензом концентрацией 20 мкМ привело к существенному усилению дегрануляции Т-клеток по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, представляется, что, в противоположность тому, что наблюдалось в случае гуанабенза, сунитиниб не способен усиливать функцию Т-клеток *in vitro*, как в низкой концентрации (то есть, 0,1 мкмоль/л), так и в высокой концентрации (то есть, 4 мкмоль/л).

*Действие сунитиниба in vivo в рамках модели меланомы TiRP*

Мышам с опухолью TiRP, полученным как описано выше в настоящем документе (см. Пример 1), вводили сунитиниб и осуществляли адоптивный перенос клеток (АПК) введением 10 миллионов P1A-специфичных активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Ежедневное введение сунитиниба (20 мг/кг;

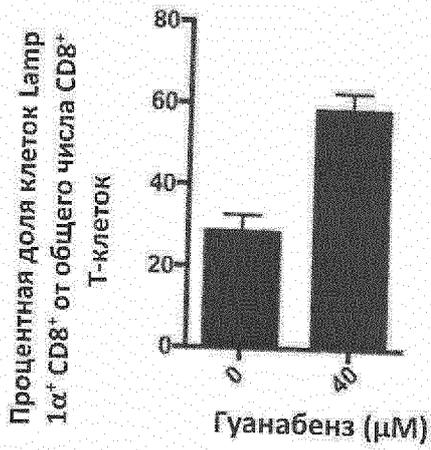
через желудочный зонд) проводили, таким образом, начиная с дня АПК (день 0), когда размер опухоли составлял приблизительно 500 мм<sup>3</sup>, до дня умерщвления (день 10). Как показано на **Фигуре 12В**, не наблюдалось значительного снижения роста опухоли при осуществлении АПК совместно с введением сунитиниба по сравнению с только АПК (контрольная группа, соответствующая введению фосфатно-солевого буфера). Соответственным образом, после введения сунитиниба не повышалась инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками (**Фигура 12С**). Данные результаты показывают, что сунитиниб не увеличивает терапевтическую эффективность адоптивного переноса клеток, в противоположность результатам, наблюдавшимся в случае гуанабенза (см. **Фигуру 5**).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

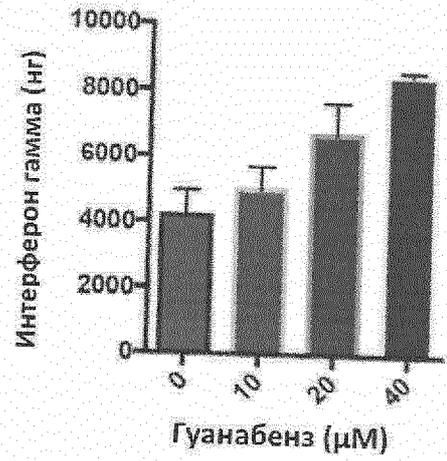
1. Применение гуанабенза в сочетании с иммунотерапией для лечения онкологического или инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении.
2. Применение по п. 1, где гуанабенз используется в качестве адъюванта для иммунотерапии.
3. Применение по п. 1, где гуанабенз используется в качестве режима кондиционирования для иммунотерапии, при этом режим кондиционирования представляет собой терапию для подготовки субъекта к иммунотерапии.
4. Применение по любому из пп. 1-3, где гуанабенз используется с иммунотерапией в лечении солидного рака, выбранного из группы, включающей меланому, карциному молочной железы, карциному толстой кишки, карциному почки, аденокарциному, тестикулярную тератому, саркому кожи, фибросаркому, карциному легкого, аденокарциному, карциному печени, глиобластому, карциному предстательной железы и карциному поджелудочной железы.
5. Применение по любому из пп. 1-3, где гуанабенз используется с иммунотерапией в лечении инфекционного заболевания, вызванного вирусом, бактерией, грибом или простейшим паразитом.
6. Применение по любому из пп. 1-5, где гуанабенз подлежит введению до иммунотерапии и/ или одновременно с иммунотерапией.
7. Применение по любому из пп. 1-6, где гуанабенз подлежит введению в дозе, лежащей в диапазоне от приблизительно 0,01 мг на килограмм массы тела (мг/кг) до приблизительно 15 мг/кг.
8. Применение по любому из пп. 1-7, где упомянутая иммунотерапия включает адаптивный перенос иммунных клеток.
9. Применение по п. 8, где упомянутые иммунные клетки представляют собой Т-клетки или естественные клетки-киллеры (NK-клетки).

10. Применение по п. 8 или п. 9, где упомянутые иммунные клетки представляют собой CAR T-клетки или CAR NK-клетки.
11. Применение по любому из пп. 8-10, где упомянутые иммунные клетки представляют собой аутологичные иммунные клетки.
12. Применение по любому из пп. 8-11, где упомянутые иммунные клетки представляют собой CD8<sup>+</sup> T-клетки.
13. Применение по любому из пп. 1-7, где упомянутая иммунотерапия включает ингибитор иммунных контрольных точек.
14. Применение по п. 13, где упомянутый ингибитор иммунных контрольных точек выбран из группы, включающей ингибиторы PD-1, например, пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, тислелизумаб, спартализумаб, ABBV-181 и JNJ-63723283, ингибиторы PD-L1, например, авелумаб, атезолизумаб и дурвалумаб, ингибиторы CTLA-4, например, ипилимумаб и тремелимумаб, и любые сочетания таковых.
15. Применение по любому из пп. 1-7, где упомянутая иммунотерапия включает в себя вакцинацию.

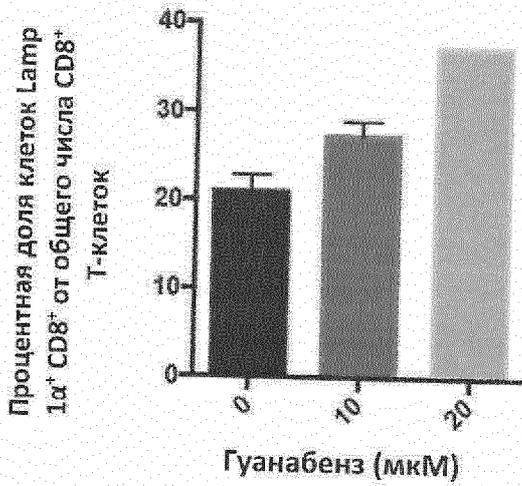
Фиг. 1А



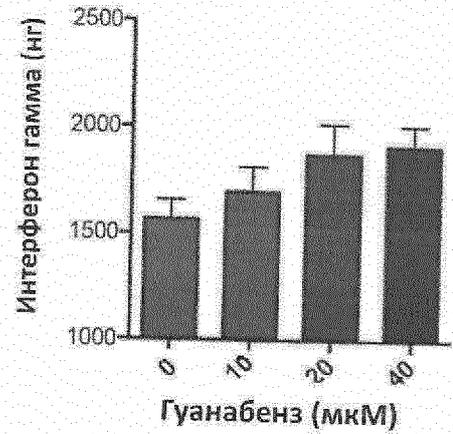
Фиг. 1В

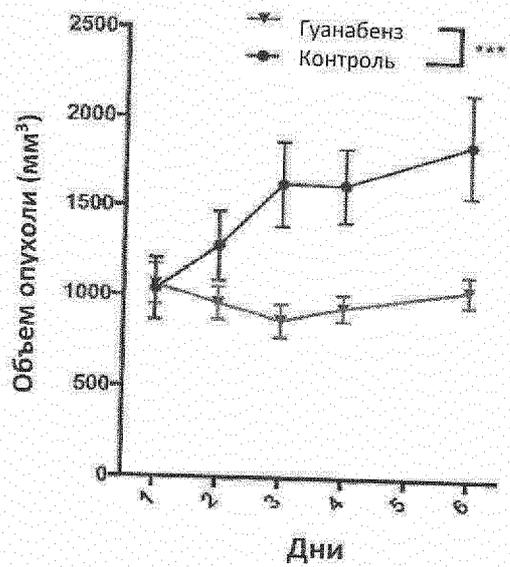


Фиг. 1С

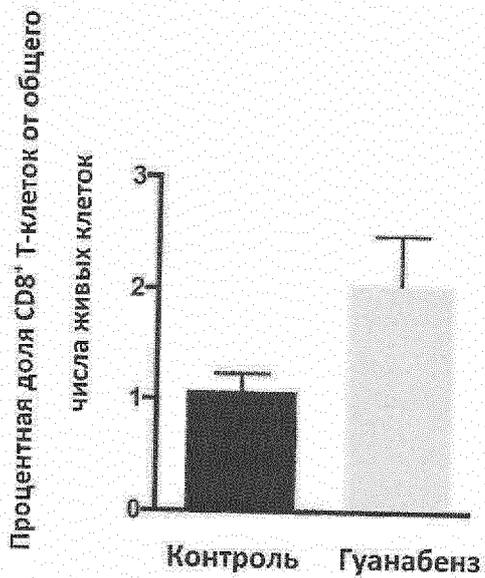


Фиг. 1D

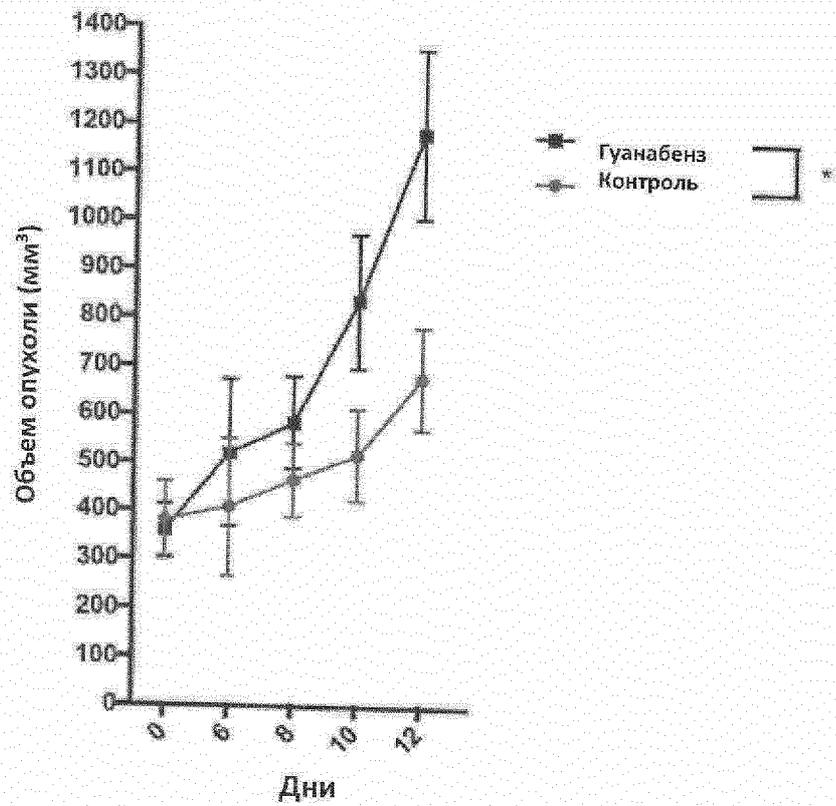




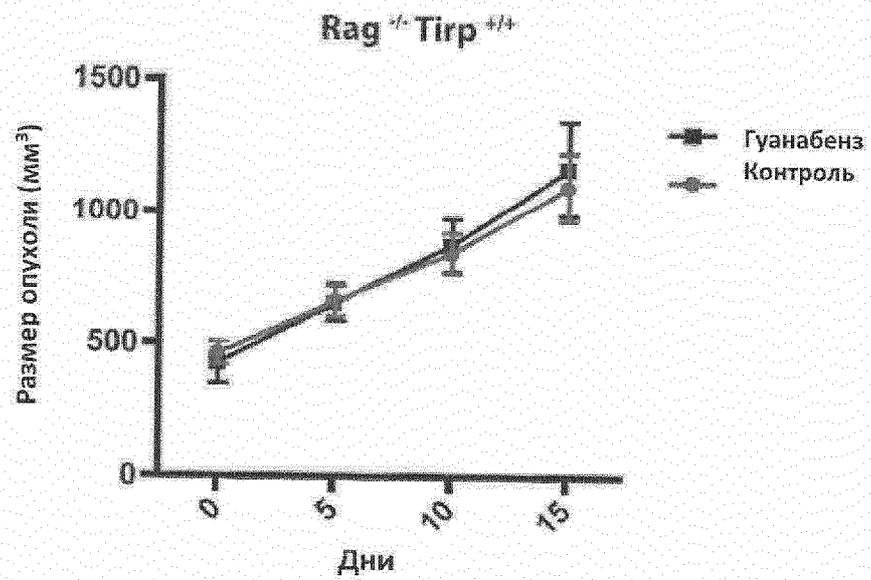
Фиг. 2А



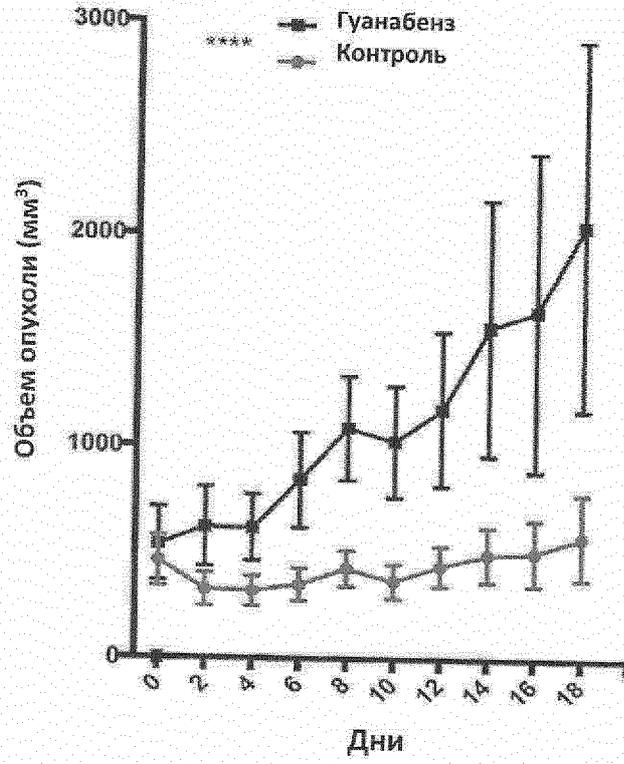
Фиг. 2В



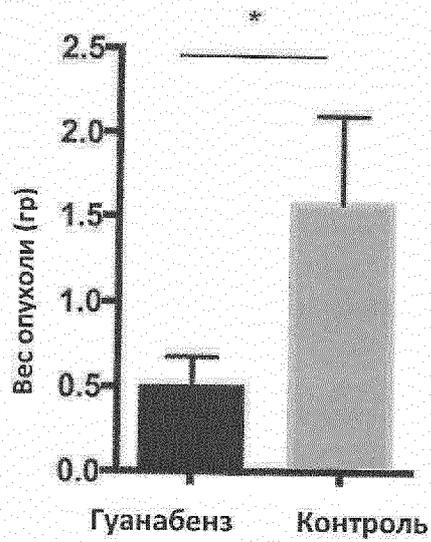
Фиг. 3



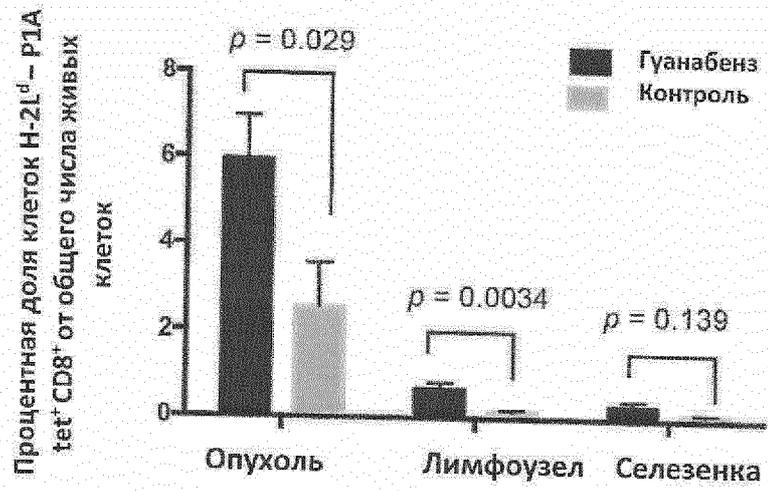
Фиг. 4



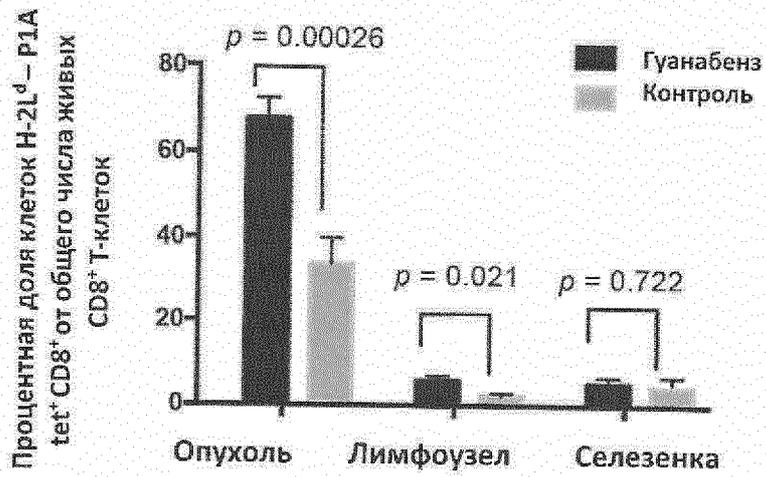
Фиг. 5А



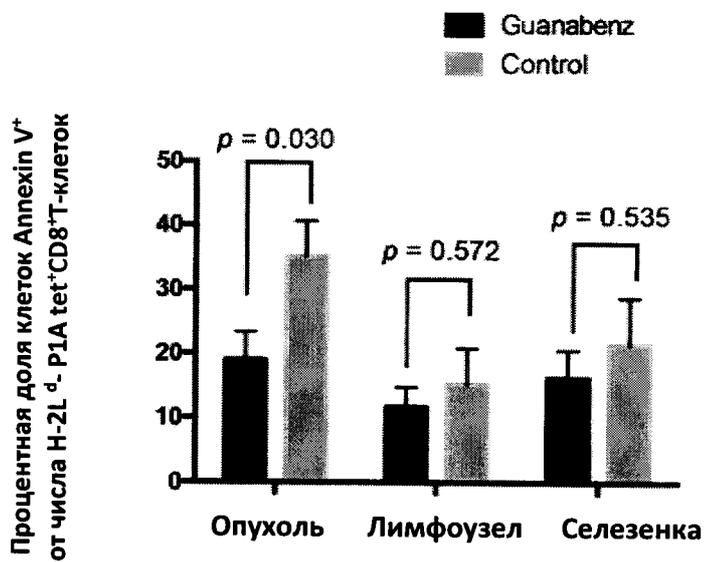
Фиг. 5В



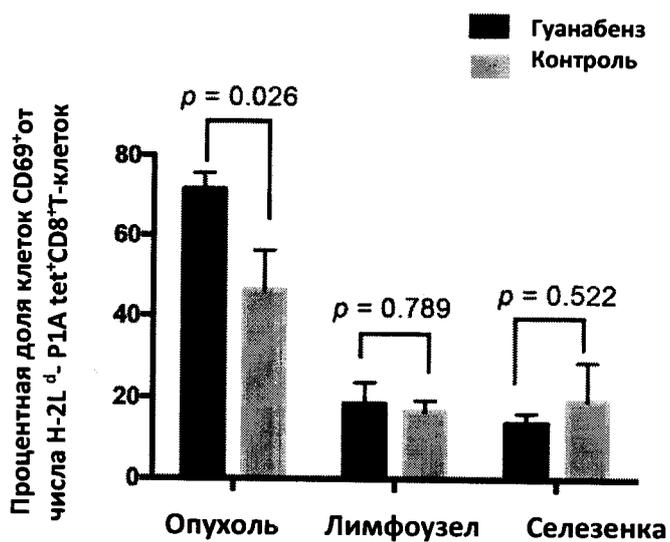
Фиг. 5C



Фиг. 5D

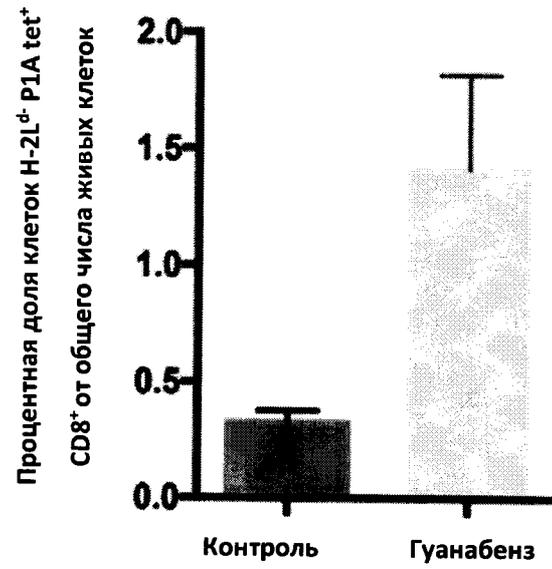


Фиг. 5E

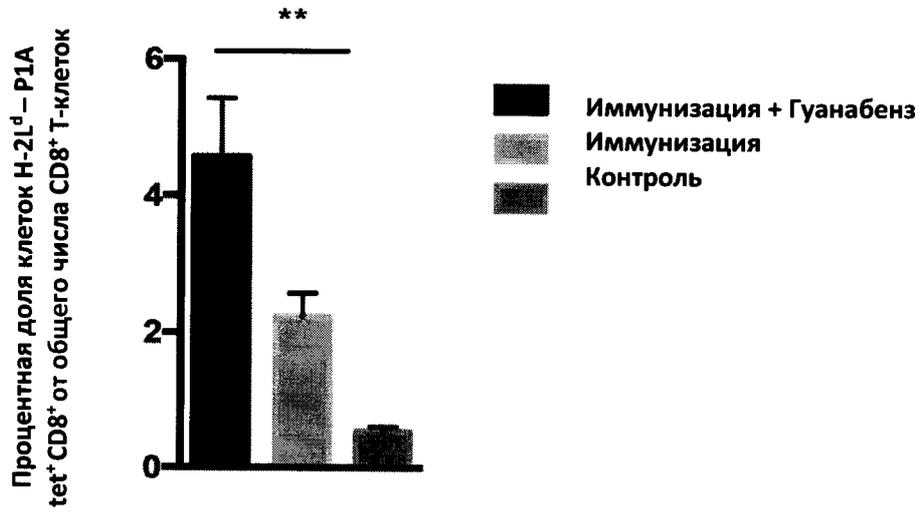


Фиг. 5F

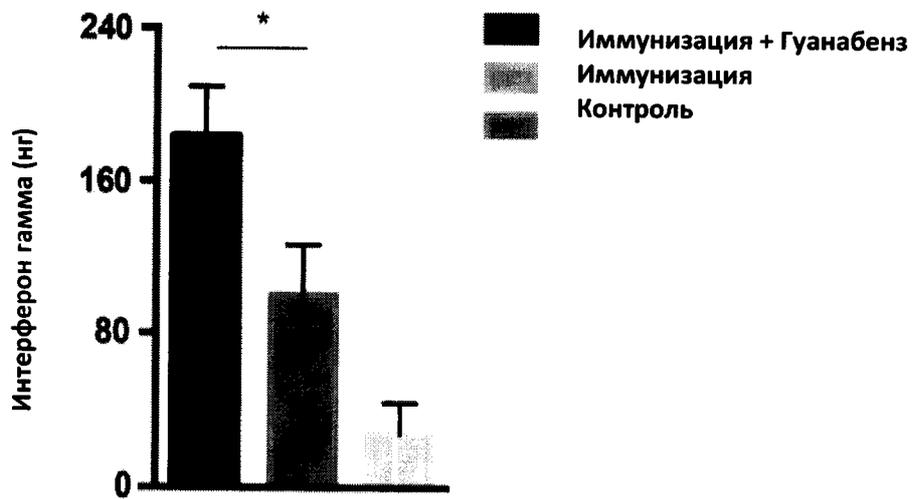
## Адоптивный перенос нативных TCRP1A CD8+T-клеток



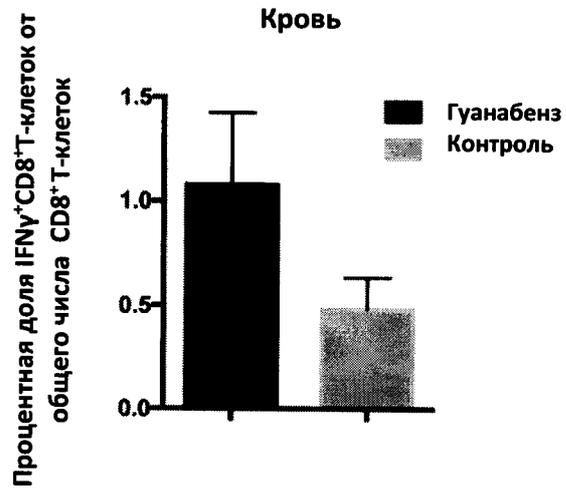
Фиг. 6



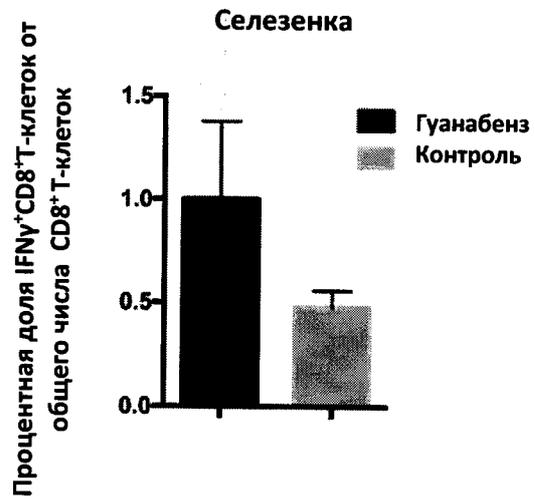
Фиг. 7А



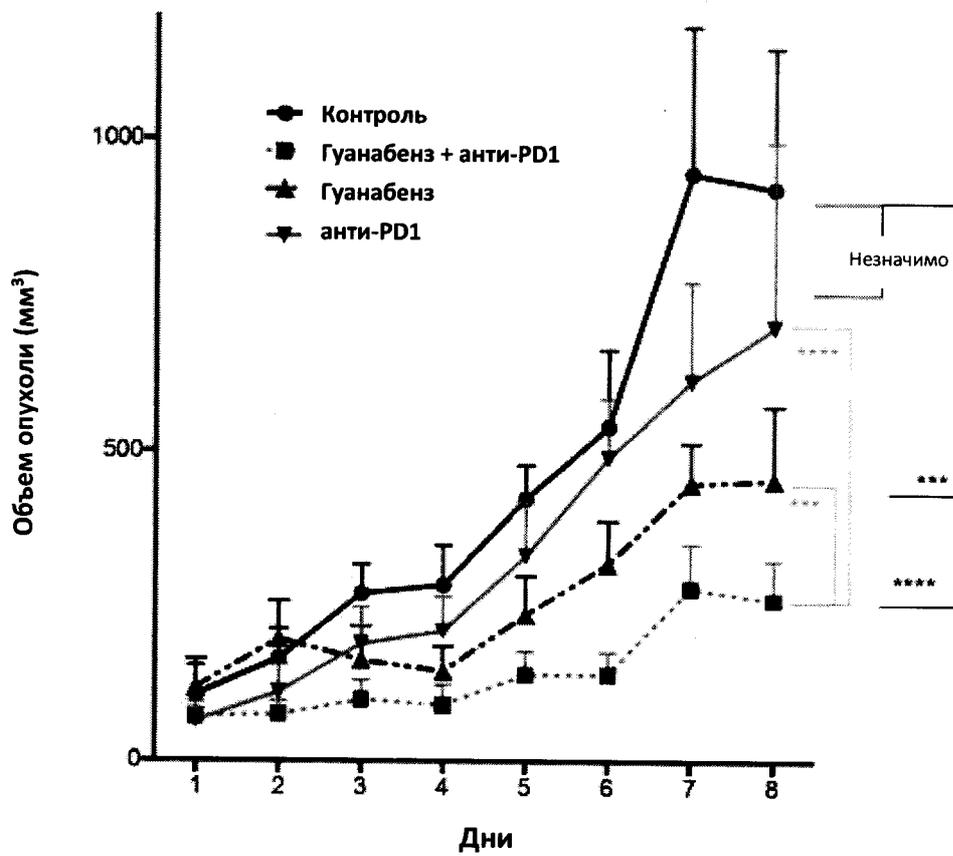
Фиг. 7В



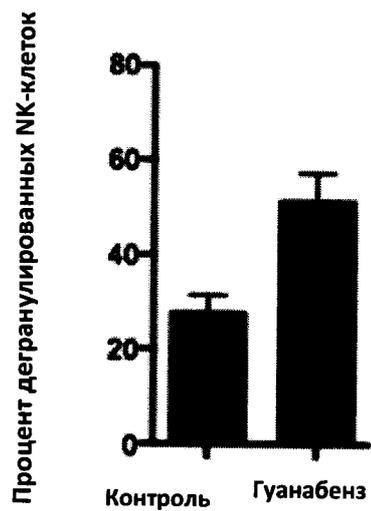
Фиг. 8А



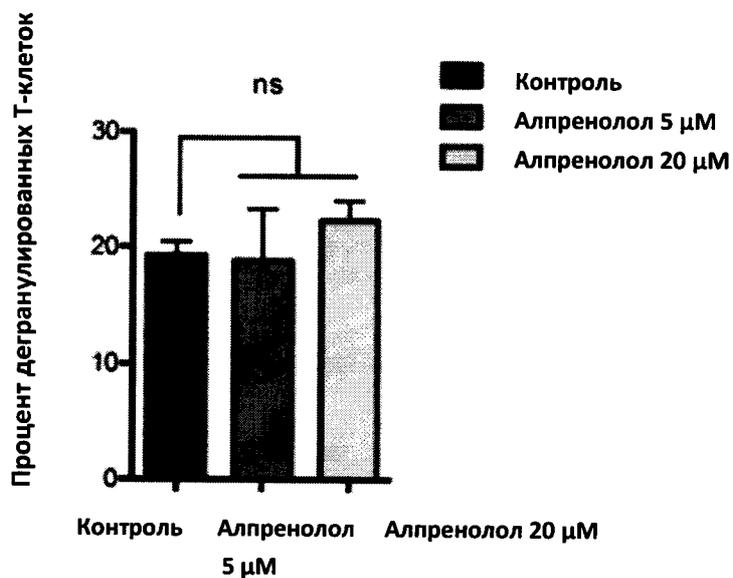
Фиг. 8В



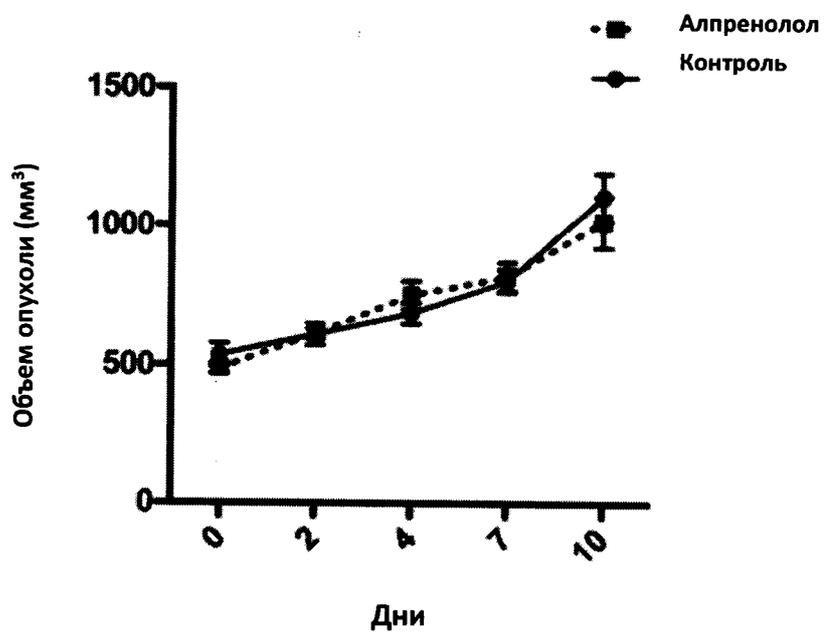
Фиг. 9



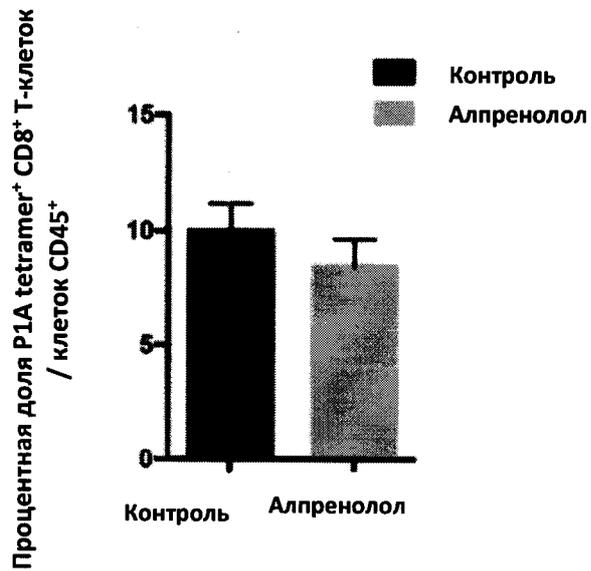
Фиг. 10



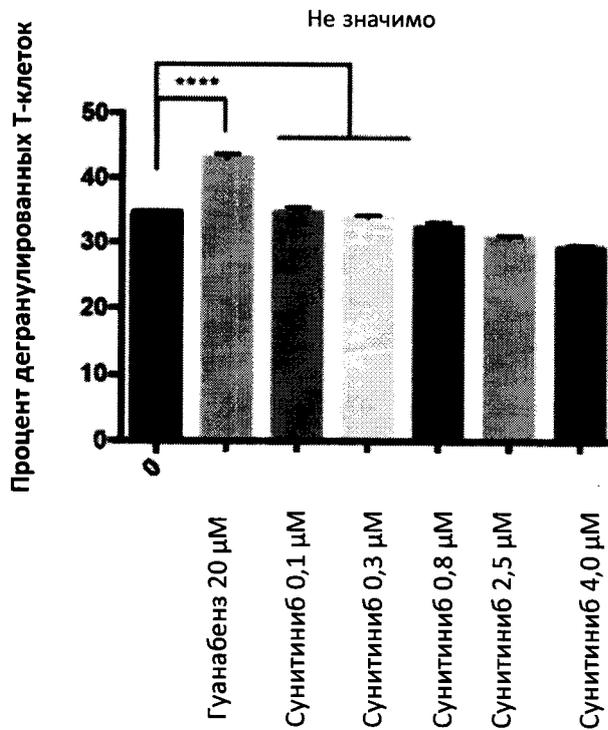
Фиг. 11А



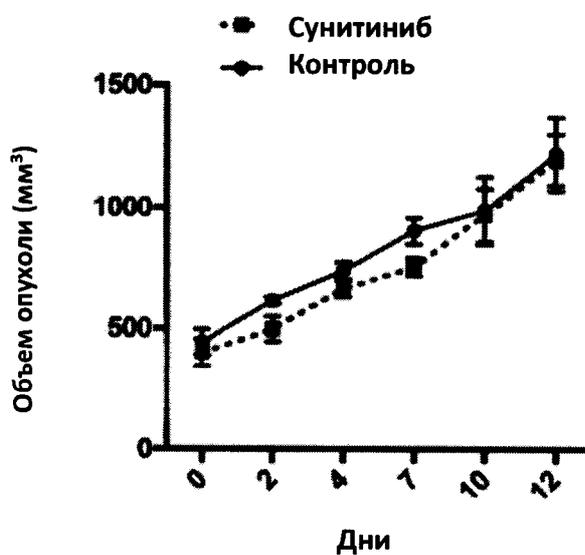
Фиг. 11В



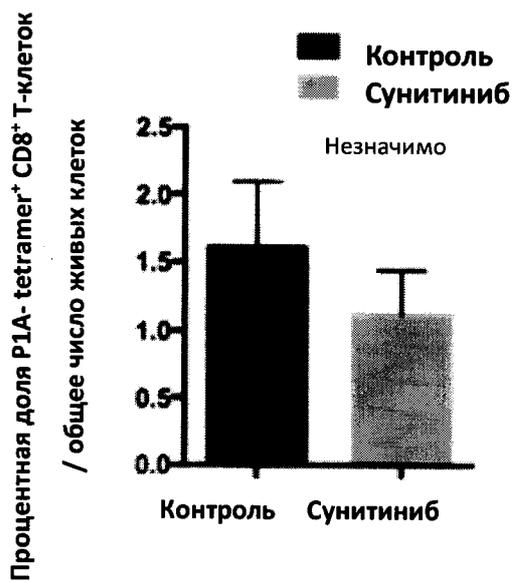
Фиг. 11С



Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С