

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193121 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.21

(22) Дата подачи заявки
2020.05.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/085* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА

(31) 62/848,518

(32) 2019.05.15

(33) US

(86) PCT/IL2020/050533

(87) WO 2020/230142 2020.11.19

(71) Заявитель:
НЕОТКС ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (IL)

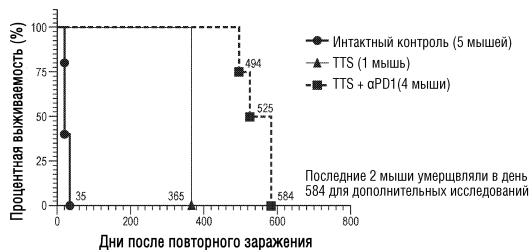
(72) Изобретатель:

Шахар Михал, Азулай Меир, Натан
Ашер (IL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены способы или композиции для лечения рака с применением конъюгата суперантигена, необязательно в комбинации с ингибитором на основе PD-1.



202193121

A1

A1

202193121

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571883EA/050

ЛЕЧЕНИЕ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущества и приоритет по предварительной заявке на патент США 62/848,518, поданной 15 мая 2019 года, все содержание которой настоящим включено посредством отсылок во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Изобретение в целом относится к способам и композициям для лечения рака с применением конъюгата суперантигена, необязательно в комбинации с иммунопотенциатором, например, ингибитором на основе PD-1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] По данным Американского онкологического общества, ежегодно более миллиона человек в США заболевают раком. Рак - это заболевание, которое возникает в результате неконтролируемой пролиферации клеток, на которые ранее действовали естественные механизмы контроля, но которые переродились в раковые клетки, которые продолжают бесконтрольно размножаться. В последние годы был разработан ряд иммунотерапий, в которых иммунную систему субъекта пытались задействовать для поиска и уничтожения раковых клеток. Такие иммунотерапии включают, например, такие, которые разработаны для усиления естественной защиты организма для борьбы с раком с применением природных молекул, вырабатываемых организмом, или, в альтернативе, путем введения рекомбинантных молекул, созданных для улучшения, лучшего воздействия или восстановления функции иммунной системы. Некоторые иммунотерапии включают введение соединений, известных как неспецифические усилители иммунной системы, такие как цитокины, например, IL-2 и интерферон. Хотя различные иммунотерапии, разработанные на сегодняшний день, показали свою эффективность, они могут быть ассоциированы с побочными эффектами, включающими, например, нецелевую активность, аллергические реакции на вводимые активные вещества, включая возможность цитокинового шторма, потерю активности, вызванную стимуляцией антител, которые связывают и нейтрализуют такие активные вещества, снижение количества клеток крови и утомляемость.

[0004] В других иммунотерапиях применяются молекулы, называемые ингибиторами иммунных контрольных точек, которые усиливают иммунный ответ против рака. Такие ингибиторы контрольных точек подавляют способность раковых клеток блокировать иммунные ингибирующие контрольные точки, что приводит к повышению эффективности противоопухолевой терапии. Ингибитор иммунных контрольных точек первого поколения ипилимумаб (Ервой[®]; Bristol-Myers Squibb) был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в 2011 году и представляет собой моноклональное IgG1 антитело, которое может вызывать ADCC-опосредованную цитотоксичность регуляторных Т-клеток (Treg). В течение

нескольких лет иммунохимиотерапия, комбинация иммунотерапии и химиотерапии, стала важной при лечении некоторых онкологических заболеваний. Например, ритуксимаб (Ритуксан[®]; Roche) представляет собой CD-20-специфичное моноклональное антитело, которое элиминирует клетки, экспрессирующие CD20, и стало стандартным компонентом терапии для лечения В-клеточных лимфом, например неходжкинской лимфомы, с применением ритуксимаба (R), циклофосфида (C), гидроксидаунорубицина (H), онковина (O) и преднизона (P), известной как R-CHOP.

[0005] Недавно были одобрены такие ингибиторы PD-1, как ниволумаб и пембролизумаб, которые блокируют передачу ингибирующих сигналов между PD-1 и PD-L1. Хотя эти лекарственные средства усиливали устойчивые ответы у некоторых пациентов, проценты ответов на эти лекарственные средства в виде монотерапии были низкими и находились в пределах 21%, и процент пациентов с полным ответом в нескольких исследованиях составил приблизительно 1%.

[0006] Несмотря на то, что в настоящее время продолжают прилагать усилия по комбинированию различных противоопухолевых терапий для улучшения результатов лечения пациентов, и некоторые комбинации показали преимущества в эффективности, безопасность стала наиболее важным вопросом, поскольку комбинации лекарственных средств могут усиливать серьезные побочные эффекты. Например, связанные с применением лекарственных средств нежелательные эффекты 3 или 4 степени были зарегистрированы у значительного числа пациентов, которые получали комбинацию антител против CTLA-4 и против PD-1, по сравнению с пациентами, которые получали только антитело против CTLA-4.

[0007] Соответственно, несмотря на значительные достижения в области иммунотерапии и онкологии, сохраняется потребность в безопасных и эффективных иммунотерапиях для лечения рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В последние годы было разработано множество иммунотерапий, в которых пытались использовать иммунную систему субъекта для поиска и разрушения раковых клеток. Несмотря на то, что человеческая иммунная система способна устранять раковые клетки, у некоторых раковых клеток развивается способность "выключать", "снижать" или иным образом уклоняться от активности иммунной системы хозяина, что позволяет раковым клеткам продолжать неконтролируемый рост и пролиферацию.

[0009] Изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против рака у субъекта может быть значительно усилен путем комбинирования конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4) с иммунопотенциатором, например ингибитором на основе PD-1.

[0010] Кроме того, было обнаружено, что введение конъюгата суперантигена, содержащего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4), может способствовать противоопухолевой

иммунной памяти. Без ограничения теорией, предполагается, что конъюгат суперантигена может способствовать распространению эпитопа, то есть конъюгат суперантигена может вызывать у субъекта первичный иммунный ответ, опосредованный суперантигеном (который направлен на эпитоп ракового антигена посредством конъюгата суперантигена), который затем распространяется с одним или больше иммунными ответами против других эпитопов на других раковых антигенах. В результате конъюгат суперантигена, необязательно в комбинации с иммунопотенциатором, например, ингибитором на основе PD-1, может лечить рак, лечить резистентный в иных условиях рак, задерживать рецидив рака и/или снижать вероятность рецидива рака.

[0011] В одном аспекте изобретения предложен способ снижения вероятности рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0012] В другом аспекте изобретения предложен способ задержки рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0013] В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака и стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0014] В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у субъекта, имеющего рак. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0015] В другом аспекте изобретения предложен способ индукции по меньшей мере первого и второго эпитопспецифичного иммунного ответа у субъекта, имеющего рак. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим

фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1, где первый эпитопспецифичный иммунный ответ направлен на раковый антиген посредством конъюгата суперантигена, и второй эпитопспецифичный иммунный ответ не направлен на раковый антиген или суперантиген и опосредован распространением эпитопа.

[0016] В другом аспекте изобретения предложен способ опосредования длительного (например, по меньшей мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или больше) иммунного ответа против множества различных раковых антигенов, экспрессируемых раковой клеткой у субъекта, нуждающегося в лечении. Способ включает (или по существу состоит из) введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает один тип ракового антигена, экспрессируемого раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов рак представляет собой 5T4-экспрессирующий рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака толстой кишки и рака толстой и прямой кишки.

[0018] В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, которая не экспрессирует раковый антиген 5T4. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген 5T4, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1. В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, не экспрессирующей раковый антиген EpCAM. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген EpCAM, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка выбрана из клетки рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака

печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка выбрана из клетки рака толстой кишки и рака толстой и прямой кишки.

[0019] В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов раковый антиген выбран из EpCAM и 5T4. В некоторых вариантах осуществления раковым антигеном является 5T4.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов субъект ранее получал различную противоопухолевую терапию, например, противоопухолевую терапию, включающую введение субъекту Т-клеточного химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифичного активатора Т-клеток (BiTE). В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным к противоопухолевой терапии и/или рецидивировал после противоопухолевой терапии.

[0022] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов конъюгат суперантигена вводят субъекту до, одновременно или после иммунопотенциатора.

[0023] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологический вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов направляющий фрагмент является антителом, например, антителом против 5T4, например, антителом против 5T4, включающим Fab-фрагмент, который связывает раковый антиген 5T4. В некоторых вариантах осуществления антитело против 5T4 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-222 из SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 из SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO:9.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих способов ингибитор PD-1 является антителом против PD-1, например, антителом против PD-1, выбранным из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 является антителом против PD-L1, например, антителом

против PD-L1, выбранным из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

[0026] Эти и другие аспекты и признаки изобретения описаны в следующем подробном описании, фигурах и формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0027] Вышеуказанные и другие объекты, признаки и преимущества изобретения станут очевидными из следующего описания предпочтительных вариантов осуществления, как проиллюстрировано на прилагаемых чертежах. Элементы, указанные одинаковыми позициями, обозначают общие признаки на соответствующих чертежах. Чертежи не обязательно выполнены в масштабе, вместо этого сделан акцент на иллюстрацию принципов настоящего изобретения.

[0028] **ФИГУРА 1** - схематическое изображение примерного способа лечения согласно изобретению с применением конъюгата суперантигена и ингибитора на основе PD-1.

[0029] **ФИГУРА 2** - выравнивание последовательностей, на котором показаны гомологичные области А-Е в некоторых суперантигенах дикого типа и модифицированных суперантигенах.

[0030] **ФИГУРА 3** - аминокислотная последовательность, соответствующая примерному конъюгату суперантигена, наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], который включает две белковых цепи. Первая белковая цепь включает остатки 1-458 из SEQ ID NO: 7 (см. также, SEQ ID NO: 8), и включает химерную 5T4 Fab тяжелую цепь, соответствующую остаткам 1-222 из SEQ ID NO: 7, и суперантиген SEA/E-120, соответствующий остаткам 226-458 из SEQ ID NO: 7, ковалентно связанный через трипептидный линкер GGP, соответствующий остаткам 223-225 из SEQ ID NO: 7. Вторая цепь включает остатки 459-672 из SEQ ID NO: 7 (см. также SEQ ID NO: 9) и включает химерную 5T4 Fab легкую цепь. Две белковых цепи удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями между Fab тяжелыми и легкими цепями.

[0031] **ФИГУРЫ 4А-4Д** представляют собой линейные графики, иллюстрирующие эффект C215Fab-SEA и мАт против PD-1, отдельно или в комбинации, в отношении объема опухоли в модели опухоли толстой кишки у мышей MC38-EpCAM. Показан рост опухоли у отдельных мышей в каждой группе лечения (n=10), причем на **ФИГУРЕ 4А** представлен контроль растворителем, на **ФИГУРЕ 4В** представлено только мАт против PD-1, на **ФИГУРЕ 4С** представлен только C215Fab-SEA, и на **ФИГУРЕ 4Д** представлены C215Fab-SEA и мАт против PD-1 в комбинации. TTS=C215Fab-SEA; αPD1=мАт против PD-1; и TF=без опухоли (т.е. полный ответ).

[0032] **ФИГУРА 5** представляет собой линейный график, иллюстрирующий эффект C215Fab-SEA и мАт против PD-1, отдельно или в комбинации, в отношении объема опухоли в модели опухоли толстой кишки у мышей MC38-EpCAM. Приведенные данные представляют собой среднее и стандартную ошибку (SE) индивидуальных объемов опухоли, показанных на **ФИГУРЕ 4**. ***p<0,0001 в 19 день лечения в сравнении с контролем; и в 22 день комбинации в сравнении с отдельным введением TTS или

антитела к PD-1. TTS=C215Fab-SEA; α PD1=мАт против PD-1; и TGI=ингибирование роста опухоли.

[0033] **ФИГУРА 6** представляет собой линейный график, иллюстрирующий долгосрочную выживаемость в модели опухоли толстой кишки у мышей MC38-EpCAM после трех курсов лечения C215Fab-SEA и мАт против PD-1 отдельно или в комбинации. n=10 для каждой группы лечения. *p=0,02; **p=0,006; ***p=0,0002; TTS=C215Fab-SEA; α PD1=мАт против PD-1; и CR=полный ответ.

[0034] **ФИГУРА 7** представляет собой линейный график, иллюстрирующий массу тела в модели опухоли толстой кишки у мышей MC38-EpCAM после лечения C215Fab-SEA и мАт против PD-1 отдельно или в комбинации. n=10 мышей для каждой группы лечения (первоначально, при этом знак * указывает число мышей, оставшихся в день 32 в каждой группе лечения). TTS=C215Fab-SEA; и α PD1=мАт против PD-1.

[0035] **ФИГУРА 8** представляет собой линейный график, иллюстрирующий объем опухоли после повторного введения мышам, которые ранее получали и демонстрировали полный ответ на терапию C215Fab-SEA или C215Fab-SEA и мАт против PD-1, клеток рака толстой кишки MC38-EpCAM. TTS=C215Fab-SEA; α PD1=мАт против PD-1; и ТВ=объем опухоли.

[0036] **ФИГУРА 9** представляет собой линейный график, иллюстрирующий объем опухоли повторного введения мышам, которые ранее получали и демонстрировали полный ответ на терапию C215Fab-SEA или C215Fab-SEA и мАт против PD-1, исходных клеток рака толстой кишки MC38. TTS=C215Fab-SEA; и α PD1=мАт против PD-1; и ТВ=объем опухоли.

[0037] **ФИГУРЫ 10А и 10В** представляют собой линейные графики, иллюстрирующие процентную выживаемость мышей, которые ранее получали и демонстрировали полный ответ на терапию C215Fab-SEA или C215Fab-SEA и мАт против PD-1, после повторного введения клеток рака толстой кишки MC38. TTS=C215Fab-SEA; и α PD1=мАт против PD-1. На **ФИГУРЕ 10А** показаны первоначальные результаты после 203 дней исследования и на **ФИГУРЕ 10В** показаны полные результаты исследования.

[0038] **ФИГУРЫ 11А-11Н** представляют собой контурные графики, иллюстрирующие пролиферацию Т-клеток, выделенных у указанных мышей в ответ на инкубирование с раковыми клетками MC38 ("MC38") или раковыми клетками MC38-EpCAM ("MC38-C215"). На **ФИГУРЕ 11А** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-EpCAM. На **ФИГУРЕ 11В** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-EpCAM. На **ФИГУРЕ 11С** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38-EpCAM. На **ФИГУРЕ 11Д** показан процент пролиферирующих TRBV3-

отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38. На **ФИГУРЕ 11Е** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 11F** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 11G** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 11H** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38.

[0039] **ФИГУРЫ 12А-12Н** представляют собой контурные графики, иллюстрирующие пролиферацию CD62L-отрицательных эффекторных Т-клеток, выделенных у указанных мышей в ответ на инкубирование с раковыми клетками MC38 ("MC38") или раковыми клетками MC38-ЕрСАМ ("MC38-C215"). На **ФИГУРЕ 12А** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12В** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12С** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12D** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD4 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38. На **ФИГУРЕ 12Е** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12F** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12G** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 12H** показан процент пролиферирующих TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток после инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших C215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2),

которым повторно вводили клетки MC38.

[0040] **ФИГУРЫ 13А-13Н** представляют собой точечные графики, иллюстрирующие уровни Гранзима В, ФНО α и IFN γ в Т-клетках, выделенных у указанных мышей в ответ на повторную стимуляцию и инкубирование с раковыми клетками MC38 ("MC38") или раковыми клетками MC38-ЕрСАМ ("MC38-С215"). На **ФИГУРЕ 13А** показан процент пролиферирующих Гранзим В-положительных, TRBV3-отрицательных CD8 цитотоксических Т-клеток после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13В** показан процент пролиферирующих Гранзим В-положительных, TRBV3-отрицательных CD8 цитотоксических Т-клеток после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13С** показан процент пролиферирующих Гранзим В-положительных, TRBV3-отрицательных CD8 цитотоксических Т-клеток после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших С215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13D** показан процент пролиферирующих Гранзим В-положительных, TRBV3-отрицательных CD8 цитотоксических Т-клеток после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенных у вылеченных мышей (ранее получавших С215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), которым повторно вводили клетки MC38. На **ФИГУРЕ 13Е** показан процент TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток, продуцирующих ФНО α и/или IFN γ , после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенные у контрольных интактных мышей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13F** показан процент TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток, продуцирующих ФНО α и/или IFN γ , после повторной стимуляции и инкубирования Т-клеток, выделенных у контрольных мышей-опухоленосителей, с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13G** показан процент TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток, продуцирующих ФНО α и/или IFN γ , после того, как Т-клетки, выделенные у повторно зараженных вылеченных мышей (ранее получавших С215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), повторно стимулировали и инкубировали с клетками MC38-ЕрСАМ. На **ФИГУРЕ 13H** показан процент TRBV3-отрицательных CD8 Т-клеток, продуцирующих ФНО α и/или IFN γ , после того, как Т-клетки, выделенные у повторно зараженных вылеченных мышей (ранее получавших С215Fab-SEA и мАт против PD-1, как описано в Примере 2), повторно стимулировали и инкубировали с клетками MC38.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0041] Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения рака у субъекта. В частности, изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против рака у субъекта может быть значительно усилен благодаря комбинированию конъюгата суперантигена, содержащего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген

(например, 5T4) с иммунопотенциатором, например, ингибитором на основе PD-1. Было обнаружено, что введение конъюгата суперантигена вместе с иммунопотенциатором может привести к усилению противоопухолевого эффекта как конъюгата суперантигена, так и иммунопотенциатора, при их комбинировании друг с другом (т.е. средства действуют синергически) с получением эффекта, превышающего аддитивный эффект каждого средства при отдельном введении.

[0042] Кроме того, было обнаружено, что введение конъюгата суперантигена, содержащего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4), может способствовать противоопухолевой иммунной памяти. Эти результаты являются неожиданными, особенно с учетом того, что некоторые другие иммунотерапии, которые направляют Т-клетки на раковые антигены (например, биспецифичные антитела, специфичные к CD3), не вызывают противоопухолевый иммунный ответ памяти (см., например, Benonis et al. (2019) *MOL. CANCER THER.* 18(2):312-322).

[0043] Без ограничения теорией, предполагается, что конъюгат суперантигена может вызывать распространение эпитопа, т.е. конъюгат суперантигена может вызывать первичный иммунный ответ у субъекта, опосредуемый суперантигеном (направленный на эпитоп на раковом антигене посредством конъюгата суперантигена), который затем распространяется на один или больше иммунных ответов против других эпитопов на других раковых антигенах. В результате конъюгат суперантигена, необязательно в комбинации с иммунопотенциатором, например, ингибитором на основе PD-1, может лечить рак, лечить в других условиях рефрактерный рак, задерживать рецидив рака и/или уменьшать вероятность рецидива рака.

[0044] В одном аспекте изобретения предложен способ снижения вероятности рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0045] В другом аспекте изобретения предложен способ задержки рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или EpCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0046] В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака и стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с

направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или ErCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0047] В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у субъекта, имеющего рак. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или ErCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0048] В другом аспекте изобретения предложен способ индукции по меньшей мере первого и второго эпитопспецифичного иммунного ответа у субъекта, имеющего рак. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или ErCAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1, где первый эпитопспецифичный иммунный ответ направлен на раковый антиген посредством конъюгата суперантигена, и второй эпитопспецифичный иммунный ответ не направлен на раковый антиген или суперантиген и опосредован распространением эпитопа.

[0049] В другом аспекте изобретения предложен способ опосредования длительного (например, по меньшей мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года или больше) иммунного ответа против множества различных раковых антигенов, экспрессируемых раковой клеткой у нуждающегося в лечении субъекта. Способ включает (или состоит по существу из) введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает один тип ракового антигена, экспрессируемого раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[0050] В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, не экспрессирующей раковый антиген 5T4. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген 5T4, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1. В другом аспекте изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, не экспрессирующей раковый антиген ErCAM. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает

раковый антиген ЕpСAM, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

[0051] В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген (например, 5T4 или ЕpСAM), экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, например, ингибитора PD-1 или PD-L1.

I. Определения

[0052] Если не определено иное, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно известно среднему специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В рамках настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

[0053] При использовании в настоящем документе термины "а" или "an" могут означать один или больше. Например, такое утверждение, как "лечение суперантигеном и иммунопотенциатором", может означать лечение: одним суперантигеном и иммунопотенциатором; больше чем одним суперантигеном и одним иммунопотенциатором; одним суперантигеном и больше чем одним иммунопотенциатором; или больше чем одним суперантигеном и больше чем одним иммунопотенциатором.

[0054] В контексте настоящего описания, если не указано иное, термин "антитело" означает интактное антитело (например, интактное моноклональное антитело) или антигенсвязывающий фрагмент антитела, включая интактное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, антитело фагового дисплея, включая полностью человеческое антитело, полусинтетическое антитело или полностью синтетическое антитело), которое было оптимизировано, сконструировано или химически конъюгировано. Примерами оптимизированных антител являются антитела, полученные методом созревания аффинности. Примерами сконструированных антител являются Fc-оптимизированные антитела, антитела, модифицированные для снижения иммуногенности, и мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела). Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечные антитела (например, scFv), минитела и диатела. Антитело, конъюгированное с фрагментом токсина, является примером химически конъюгированного антитела.

[0055] Подразумевается, что при использовании в настоящем документе термины "рак" и "злокачественный" означают физиологическое состояние у млекопитающих, как правило, характеризующееся нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, без ограничения, меланому, карциному, лимфому, бластому, саркому, а также лейкоз или

лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры рака включают плоскоклеточный рак (например, плоскоклеточный эпителиальный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак костей, рак головного мозга, ретинобластому, рак эндометрия или карциному матки, рак слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному анального канала, карциному полового члена, рак яичка, а также рак головы и шеи, рак десен или языка. Рак включает раковые клетки, например, рак может включать множество отдельных раковых клеток, например, лейкоз, или опухоль, включающую множество ассоциированных раковых клеток.

[0056] При использовании в настоящем документе термин "рефрактерный" относится к раку, который не отвечает или больше не реагирует на лечение. В некоторых вариантах осуществления рефрактерный рак может быть резистентным к лечению до или в начале лечения. В других вариантах осуществления рефрактерный рак может стать резистентным во время или после лечения. Рефрактерный рак также называют резистентным раком. При использовании в настоящем документе термин "рецидив" относится к возврату рефрактерного рака или признаков и симптомов рефрактерного рака после положительного ответа на предыдущее лечение (например, уменьшения опухолевой нагрузки, уменьшения объема опухоли, уменьшения метастазов опухоли или модуляции биомаркера, указывающей на положительный ответ на лечение).

[0057] При использовании в настоящем документе термин "иммуноген" означает молекулу, которая провоцирует (инициирует, индуцирует или вызывает) иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать выработку антител, активацию некоторых клеток, таких как, например, специфические иммунологически компетентные клетки, или и то, и другое. Иммуноген может происходить из многих типов веществ, таких как, без ограничения, молекулы из организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, убитые или инактивированные цельные клетки или лизаты, синтетические молекулы и целый ряд других средств, как биологических, так и небιологических. Известно, что практически любая макромолекула (включая встречающиеся в природе макромолекулы или макромолекулы, полученные с помощью методов рекомбинантных ДНК), включая практически все белки, может служить в качестве иммуногена.

[0058] При использовании в настоящем документе термин "иммуногенность" относится к способности иммуногена провоцировать (инициировать, индуцировать или вызывать) иммунный ответ. Различные молекулы могут обладать различной степенью иммуногенности, при этом молекула, обладающая большей иммуногенностью по сравнению с другой молекулой, как известно, например, будет способна провоцировать

(инициировать, индуцировать или вызывать) более сильный иммунный ответ, нежели средство, обладающее более низкой иммуногенностью.

[0059] При использовании в настоящем документе термин "антиген" относится к молекуле, которую распознают антитела и/или специфичные иммунологически компетентные клетки. Антиген может происходить из множества типов веществ, таких как, без ограничения, молекулы из организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, нуклеиновые кислоты, липиды, убитые или инактивированные цельные клетки или лизаты, синтетические молекулы и целый ряд других средств, как биологических, так и небιологических.

[0060] При использовании в настоящем документе термин "антигенность" относится к способности антигена распознаваться антителами и/или специфичными иммунологически компетентными клетками.

[0061] При использовании в настоящем документе термин "распространение эпитопа" относится к расширению эпитопной специфичности иммунного ответа от первоначального эпитопспецифичного иммунного ответа, направленного против антигена, к другим эпитопам на этом антигене (внутримолекулярное распространение) или других антигенах (межмолекулярное распространение). Распространение эпитопа позволяет иммунной системе субъекта определять дополнительные эпитопы-мишени, первоначально не распознаваемые иммунной системой, в ответ на исходный терапевтический протокол при снижении возможности возникновения ускользающих вариантов в популяции опухолей и, таким образом, влиять на прогрессирование заболевания.

[0062] При использовании в настоящем документе термин "иммунный ответ" относится к ответу клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка (CD4+ или CD8+), регуляторная Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, дендритная клетка, моноцит, макрофаг, NKT-клетка, NK-клетка, базофил, эозинофил или нейтрофил, на стимул. В некоторых вариантах осуществления ответ является специфичным к конкретному антигену ("антигенспецифичный ответ") и относится к ответу CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или В-клетки посредством их антигенспецифичного рецептора. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ является Т-клеточным ответом, таким как CD4+ ответ или CD8+ ответ. Такие ответы этих клеток могут включать, например, цитотоксичность, пролиферацию, продукцию цитокинов или хемокинов, миграцию или фагоцитоз, и могут зависеть от природы иммунной клетки, подвергающейся ответу.

[0063] При использовании в настоящем документе термин "главный комплекс гистосовместимости" или "МНС" относится к определенной группе генов, многие из которых кодируют эволюционно родственные белки клеточной поверхности, участвующие в презентации антигена, которые являются важными детерминантами гистосовместимости. МНС класса I или МНС-I функционируют главным образом в презентации антигена CD8+ Т-лимфоцитам (CD8+ Т-клеткам). МНС класса II или МНС-II

функционируют главным образом в презентации антигена CD4+ Т-лимфоцитам (CD4+Т-клеткам).

[0064] При использовании в настоящем документе термин "полученный", например "полученный из", включает, без ограничения, например, молекулы дикого типа, полученные из биологических хозяев, таких как бактерии, вирусы и эукариотические клетки и организмы, и модифицированные молекулы, например, измененные с помощью химических средств или продуцированные в рекомбинантных системах экспрессии.

[0065] При использовании в настоящем документе "серореактивный", "серореакция" или "серореактивность" означают способность средства, такого как молекула, реагировать с антителами в сыворотке млекопитающего, такого как, но без ограничения, человек. Это включает реакции со всеми типами антител, включая, например, антитела, специфичные к молекуле, и неспецифичные антитела, которые связываются с молекулой, независимо от того, инактивируют ли или нейтрализуют ли антитела такое средство. Как известно в уровне техники, разные средства могут иметь различную серореактивность по сравнению друг с другом, где средство, обладающее более низкой серореактивностью, чем другое, будет, например, реагировать с меньшим количеством антител и/или иметь более низкую аффинность и/или авидность к антителам, чем средство, обладающее более высокой серореактивностью. Это также может включать способность средства вызывать гуморальный иммунный ответ у животного, такого как млекопитающее, такое как человек.

[0066] При использовании в настоящем документе термины "растворимый Т-клеточный рецептор" или "растворимый TCR" означают "растворимый" Т-клеточный рецептор, содержащий цепи полноразмерного (например, мембраносвязанного) рецептора, за исключением того, что трансмембранная область цепей рецептора удалена или подвергнута мутации, в результате чего рецептор, при его экспрессии клеткой, не будет встраиваться, пересекать или иным образом связываться с мембраной. Растворимый Т-клеточный рецептор может включать только внеклеточные домены или внеклеточные фрагменты доменов рецептора дикого типа (например, без трансмембранного и цитоплазматического доменов).

[0067] При использовании в настоящем документе "суперантиген" означает класс молекул, которые стимулируют субпопуляцию Т-клеток при связывании с молекулами МНС класса II и V β -доменами Т-клеточных рецепторов, активируя таким путем Т-клетки, экспрессирующие конкретные сегменты гена V β . Термин включает встречающиеся в природе суперантигены дикого типа, например, выделенные из некоторых бактерий или экспрессируемые с немодифицированных генов из них, а также модифицированные суперантигены, где, например, последовательность ДНК, кодирующая суперантиген, была модифицирована, например, методами генной инженерии, например, с получением слитого белка с направляющим фрагментом и/или для изменения некоторых свойств суперантигена, таких как, но без ограничения, его связывание с МНС класса II (например, для снижения аффинности) и/или его серореактивность, и/или его иммуногенность, и/или

антигенность (например, для снижения его серореактивности). Определение включает суперантигены дикого типа и модифицированные суперантигены, а также их любые иммунологически реактивные варианты и/или их фрагменты, описанные в настоящем документе или в следующих патентах США и заявках на патент США: патенты США 5,858,363, 6,197,299, 6,514,498, 6,713,284, 6,692,746, 6,632,640, 6,632,441, 6,447,777, 6,399,332, 6,340,461, 6,338,845, 6,251,385, 6,221,351, 6,180,097, 6,126,945, 6,042,837, 6,713,284, 6,632,640, 6,632,441, 5,859,207, 5,728,388, 5,545,716, 5,519,114, 6,926,694, 7,125,554, 7,226,595, 7,226,601, 7,094,603, 7,087,235, 6,835,818, 7,198,398, 6,774,218, 6,913,755, 6,969,616 и 6,713,284, заявки на патент США 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190, 2002/0051765 и 2001/0046501, а также международная публикация PCT WO/03/094846.

[0068] При использовании в настоящем документе термин "направляющий фрагмент" относится к любой структуре, молекуле или фрагменту, которые способны связываться с клеточной молекулой, например молекулой клеточной поверхности, предпочтительно со специфической для заболевания молекулой, такой как антиген, экспрессируемый предпочтительно на раковой (или злокачественной) клетке. Примеры направляющих фрагментов включают, без ограничения перечисленными, антитела (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты) и т.п., растворимые Т-клеточные рецепторы, интерлейкины, гормоны и факторы роста.

[0069] Следует понимать, что при использовании в настоящем документе термины "направляющий против опухоли суперантиген" или "TTS" или "направляющий против рака суперантиген" означают молекулу, включающую один или больше суперантигенов, ковалентно связанных (напрямую или не напрямую) с одним или больше направляющими фрагментами.

[0070] Следует понимать, что при использовании в настоящем документе термин "Т-клеточный рецептор" означает рецептор, который является специфическим для Т-клеток и включает значение данного термина, известное в уровне техники. Термин также включает, например, рецептор, который включает связанный дисульфидной связью гетеродимер высоковариабельных α - или β -цепей, экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с инвариантными цепями CD3, и рецептора, состоящего из вариабельных γ и δ цепей, экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с CD3 на субпопуляции Т-клеток.

[0071] При использовании в настоящем документе термины "терапевтически эффективное количество" и "эффективное количество" означают количество действующего вещества, например, фармацевтически активного вещества или фармацевтической композиции, которое производит по меньшей мере некоторый эффект при лечении заболевания или состояния. Эффективное количество фармацевтически активного вещества(в), используемое для практического осуществления настоящего изобретения для терапевтического лечения, изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. Эти термины

включают, без ограничения перечисленным, синергические ситуации, такие как описанные в настоящем изобретении, когда только одно средство, такое как конъюгат суперантигена или ингибитор на основе PD-1 (например, антитело против PD-1), могут действовать слабо или совсем не действовать, но при их комбинировании друг с другом, например, без ограничения, посредством последовательных доз, два или более средств действуют, производя синергический результат.

[0072] При использовании в настоящем документе термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащему лечению с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают, без ограничения, млекопитающих (например, мышиных, обезьян, лошадиных, бычьих, свинообразных, псовых, кошачьих и т.п.), и более предпочтительно включает людей.

[0073] При использовании в настоящем документе термины "лечить" и "лечение" означают лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека. Это включает: (a) подавление заболевания, то есть остановку его развития; и (b) облегчение заболевания, т.е. инициирование регрессии патологического состояния; и (c) излечение заболевания. При использовании в контексте терапевтического лечения термины "предотвращать" или "блокировать" следует понимать, как полностью предотвращать или блокировать, или не полностью предотвращать или блокировать (например, частично предотвращать или блокировать) данное воздействие, действие, активность или событие.

[0074] При использовании в настоящем документе термин "ингибирует рост рака" означает измеряемое замедление, остановку или обратное изменение скорости роста раковых или злокачественных клеток *in vitro* или *in vivo*. Желательно, чтобы скорость роста была замедлена на 20%, 30%, 50% или 70% или больше, как определено при использовании подходящего анализа для определения скорости роста клеток. Как правило, обратное изменение скорости роста происходит за счет инициации или ускорения некротических или апоптотических механизмов гибели неопластических клеток, что приводит к уменьшению неоплазии.

[0075] Следует понимать, что при использовании в настоящем документе термины "вариант", "варианты", "модифицированный", "измененный", "мутантный" и т.п. означают белки или пептиды и/или другие вещества и/или соединения, которые отличаются от референсного белка, пептида или другого соединения. Варианты в этом отношении описаны ниже и в других местах более подробно. Например, изменения последовательности нуклеиновой кислоты варианта могут быть молчащими, например, они могут не вызывать изменений аминокислот, кодируемых последовательностью нуклеиновой кислоты. Если изменения ограничиваются молчащими изменениями такого типа, вариант будет кодировать пептид с такой же аминокислотной последовательностью, что и референсный пептид. Изменения последовательности нуклеиновой кислоты варианта могут приводить к изменению аминокислотной последовательности пептида, кодируемого референсной последовательностью нуклеиновой кислоты. Такие изменения нуклеиновой кислоты могут приводить к заменам, добавлениям, делециям, слияниям

и/или усечениям аминокислот в белке или пептиде, кодируемом референсной последовательностью, как обсуждается ниже. Как правило, различия в аминокислотных последовательностях ограничены, так что последовательности референсной и вариантной последовательностей в целом похожи, а во многих областях идентичны. Вариантный и референсный белок или пептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или больше заменами, добавлениями, делециями, слияниями и/или усечениями, которые могут присутствовать в любой комбинации. Вариант также может быть фрагментом белка или пептида согласно изобретению, который отличается от референсной последовательности белка или пептида тем, что он короче референсной последовательности, например, в результате концевой или внутренней делеции. Другой вариант белка или пептида согласно изобретению также включает белок или пептид, который сохраняет по существу ту же функцию или активность, что и референсный белок или пептид. Вариант также может быть: (i) вариантом, в котором один или больше аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком, при этом такой замененный аминокислотный остаток может кодироваться или может не кодироваться генетическим кодом, или (ii) вариантом, в котором один или больше аминокислотных остатков включает группу заместителя, или (iii) вариантом, в котором зрелый белок или пептид слит с другим соединением, таким как соединение для увеличения полупериода существования белка или пептида (например, полиэтиленгликоль), или (iv) вариантом, в котором дополнительные аминокислоты слиты со зрелым белком или пептидом, такие как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которая используется для очистки зрелого белка или пептида. Варианты могут быть созданы с применением методов мутагенеза и/или механизмов изменения, таких как химические изменения, слияния, присоединения и т.п., в том числе те, которые применяются к нуклеиновым кислотам, аминокислотам, клеткам или организмам, и/или могут быть получены рекомбинантными способами.

[0076] При использовании в настоящем документе термин "последовательная доза" и связанная с ним терминология относятся к введению по меньшей мере одного суперантигена, по меньшей мере с одним ингибитором на основе PD-1, и включают ступенчатые дозы этих средств (т.е. ступенчатые по времени) и вариации величины дозы. Это включает введение одного средства до, совпадающее с (частично или полностью) или после введения другого средства. Этот термин обычно предусматривает наилучшую схему введения для достижения синергической комбинации по меньшей мере одного суперантигена и по меньшей мере одного ингибитора на основе PD-1. С помощью такой стратегии введения доз (например, последовательных доз) можно достичь синергических эффектов от комбинированного введения суперантигена и ингибитора на основе PD-1. Кроме того, термин "последовательная доза" и связанная с ним терминология также включают введение по меньшей мере одного суперантигена, одного ингибитора на основе PD-1 и одного или больше необязательных дополнительных соединений, таких как, например, кортикостероид, иммуномодулятор и другое средство, предназначенное для

снижения потенциальной иммунореактивности по отношению к конъюгату суперантигена, вводимому субъекту.

[0077] При использовании в настоящем документе термины "системный" и "системно" в контексте введения следует понимать, как означающие введение средства таким образом, чтобы средство подвергалось контакту по меньшей мере с одной системой, связанной со всем телом, такой как, без ограничения перечисленными, кровеносная система, иммунная системы и лимфатическая система, а не только с локализованной частью тела, такой как, без ограничения, опухоль. Таким образом, например, системная терапия или средство, вводимое системно, представляет собой терапию или средство, где по меньшей мере одна система, связанная со всем телом, подвергается воздействию терапии или средства, а не только ткань-мишень.

[0078] При использовании в настоящем документе термин "парентеральное введение" включает любую форму введения, при котором соединение всасывается в организме субъекта, за исключением всасывания через кишечник. Примеры парентерального введения, используемые в настоящем изобретении, включают, без ограничения перечисленным, внутримышечное, внутривенное, внутрибрюшинное или внутрисуставное введение.

[0079] При использовании термина "приблизительно" перед количественным значением настоящее изобретение также включает само определенное количественное значение, если прямо не указано иное. При использовании в настоящем документе термин "приблизительно" относится к отклонению на $\pm 10\%$ от номинального значения, если не указано или не подразумевается иное.

[0080] В различных частях настоящего описания значения раскрыты в группах или в диапазонах. В частности, предполагается, что описание включает в себя каждую отдельную субкомбинацию членов таких групп и диапазонов. Например, подразумевается, что целое число в диапазоне от 0 до 40 индивидуально раскрывает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40, и подразумевается, что целое число в диапазоне от 1 до 20 индивидуально раскрывает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

[0081] По всему тексту описания, когда композиции и наборы описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или когда процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные этапы, предполагается, что, помимо этого, существуют композиции и наборы настоящего изобретения, которые состоят или состоят по существу из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы согласно настоящему изобретению, которые состоят или состоят по существу из перечисленных этапов обработки и способа.

[0082] В настоящей заявке, когда указано, что элемент или компонент включен в перечень перечисленных элементов или компонентов и/или выбран из него, следует понимать, что элемент или компонент может быть любым из перечисленных элементов

или компонентов, или элемент или компонент может быть выбран из группы, состоящей из двух или более перечисленных элементов или компонентов.

[0083] Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описанные в настоящем документе, могут быть объединены различными путями, без отступления от сущности и объема настоящего изобретения, или явного или подразумеваемого в настоящем документе. Например, когда приводится ссылка на конкретное соединение, это соединение может применяться в различных вариантах осуществления композиций согласно настоящему изобретению и/или в способах согласно настоящему изобретению, если иное не следует из контекста. Другими словами, в данной заявке варианты осуществления были описаны и представлены таким образом, который позволяет написать и представить ясную и краткую заявку, однако предполагается и следует принять во внимание, что варианты осуществления могут быть различными способами скомбинированы или разделены, без отступления от настоящих принципов и изобретения(й). Например, следует принимать во внимание, что все признаки, описанные и представленные в настоящем документе, могут быть применены ко всем аспектам изобретения(й), описанного и представленного в настоящем документе.

[0084] Следует понимать, что выражение "по меньшей мере один из" включает индивидуально каждый из перечисленных объектов после выражения и различные комбинации двух или больше из перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и применения. Следует понимать, что выражение "и/или" в отношении трех или больше перечисленных объектов имеет такое же значение, если иное не следует из контекста.

[0085] Использование термина "включают", "включает", "включающий", "имеют", "имеет", "имеющий", "содержат", "содержит" или "содержащий", включая их грамматические эквиваленты, следует понимать в целом как открытые и неограничивающие, например, не исключающие дополнительные неперечисленные элементы или этапы, если иное прямо не указано или не следует из контекста.

[0086] Следует понимать, что порядок этапов или порядок выполнения определенных действий не имеет значения при условии, что настоящее изобретение остается функциональным. Более того, два или больше этапов или действий могут выполняться одновременно.

[0087] Применение в настоящем документе любых возможных примеров или примерных формулировок, например, "такой как" или "включающий", предназначено просто для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если это не заявлено. Никакие формулировки в описании не следует рассматривать как указывающие на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

II. Конъюгат суперантигена

A. Суперантигены

[0088] Суперантигены представляют собой бактериальные белки, вирусные белки и

белки, сконструированные человеком, способные активировать Т-лимфоциты, например, в пикомолярных концентрациях. Суперантигены также могут активировать крупные субпопуляции Т-лимфоцитов (Т-клеток). Суперантигены могут связываться с главным комплексом гистосовместимости I (МНС-I), не подвергаясь при этом процессингу, и, в частности, могут связываться с консервативными областями за пределами антигенсвязывающей бороздки на молекулах МНС класса II, по большей части избегая полиморфизма в обычном пептидсвязывающем участке. Суперантигены также могут связываться с V β -цепью Т-клеточного рецептора (TCR), но не связываться с гипервариабельными петлями Т-клеточного рецептора. Примеры бактериальных суперантигенов включают, без ограничения перечисленными, стафилококковый энтеротоксин (SE), экзотоксин *Streptococcus pyogenes* (SPE), токсин синдрома токсического шока из *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE).

[0089] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие многие суперантигены, были выделены и клонированы, и суперантигены, экспрессируемые с этих или модифицированных (реконструированных) полинуклеотидных последовательностей, были применены в противоопухолевой терапии (см. наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], обсуждаемый ниже). Суперантигены, экспрессируемые этими полинуклеотидными последовательностями, могут быть суперантигенами дикого типа, модифицированными суперантигенами или суперантигенами дикого типа или модифицированными суперантигенами, которые конъюгированы или слиты с направляющими фрагментами. Суперантигены можно вводить млекопитающему, такому как человек, напрямую, например, путем инъекции, или можно доставлять, например, при контакте крови пациента с суперантигеном вне организма, или, например, путем введения гена, кодирующего суперантиген, млекопитающему, подлежащему лечению (например, с помощью известных методов генной терапии и векторов, таких как, например, при помощи клеток, содержащих и способных экспрессировать такой ген) и экспрессии гена в организме млекопитающего.

[0090] Примеры суперантигенов и их введения млекопитающим описаны в следующих патентах и заявках на патент США: патенты США 5,858,363, 6,197,299, 6,514,498, 6,713,284, 6,692,746, 6,632,640, 6,632,441, 6,447,777, 6,399,332, 6,340,461, 6,338,845, 6,251,385, 6,221,351, 6,180,097, 6,126,945, 6,042,837, 6,713,284, 6,632,640, 6,632,441, 5,859,207, 5,728,388, 5,545,716, 5,519,114, 6,926,694, 7,125,554, 7,226,595, 7,226,601, 7,094,603, 7,087,235, 6,835,818, 7,198,398, 6,774,218, 6,913,755, 6,969,616 и 6,713,284, заявки на патент США 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190 и 2002/0051765, и Международная публикация PCT WO/03/094846.

В. Модифицированные суперантигены

[0091] В рамках настоящего изобретения суперантигены могут быть сконструированы различными способами, включая модификации, которые сохраняют или улучшают способность суперантигена стимулировать Т-лимфоциты, и могут, например, изменять другие аспекты суперантигена, такие как, например, его серореактивность или иммуногенность. Модифицированные суперантигены включают синтетические молекулы, которые обладают активностью суперантигена (т.е. способностью активировать субпопуляции Т-лимфоцитов).

[0092] Предполагается, что в полинуклеотидные последовательности, кодирующие суперантиген, могут быть внесены различные изменения без заметной потери его биологической полезности или активности, а именно индукции Т-клеточного ответа, приводящего к цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Кроме того, аффинность суперантигена к молекуле МНС класса II может быть снижена с минимальным воздействием на цитотоксичность суперантигена. Это, например, может помочь снизить токсичность, которая в противном случае может возникать, если суперантиген сохраняет свою способность дикого типа связывать антигены МНС класса II (как, в данном случае, клетки, экспрессирующие класс II, такие как клетки иммунной системы, также могут подвергаться ответу на суперантиген).

[0093] Методики модификации суперантигенов (например, полинуклеотидов и полипептидов), в том числе для создания синтетических суперантигенов, известны в уровне техники и включают, например, ПЦР-мутагенез, мутагенез методом аланинового сканирования и сайт-специфический мутагенез (см., патенты США 5,220,007; 5,284,760; 5,354,670; 5,366,878; 5,389,514; 5,635,377 и 5,789,166).

[0094] В некоторых вариантах осуществления суперантиген может быть модифицирован таким образом, что его серореактивность снижена по сравнению с референсным суперантигеном дикого типа, но при этом его способность активировать Т-клетки сохранена или повышена по сравнению с диким типом. Один из способов создания таких модифицированных суперантигенов включает замену некоторых аминокислот в некоторых областях одного суперантигена другими. Это возможно, потому что многие суперантигены, включая, помимо прочего, SEA, SEE и SED, обладают гомологией последовательностей в некоторых областях, которые были связаны с определенными функциями (Marrack and Kappler (1990) SCIENCE 248(4959):1066; см. также **ФИГУРУ 2**, на которой показана область гомологии между разными суперантигенами дикого типа и сконструированными суперантигенами). Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суперантиген, который вызывает нужный ответ, индуцирующий активацию Т-клеток, но с нежелательной высокой серореактивностью, модифицируют таким образом, что получаемый в результате суперантиген сохраняет свою способность к активации Т-клеток, но обладает сниженной серореактивностью.

[0095] Специалистам в данной области известно и ясно, что сыворотки людей обычно содержат разные титры антител против суперантигенов. Для стафилококковых суперантигенов, например, относительные титры изменяются в ряду: TSST-1>SEB>SEC-

1>SE3>SEC2>SEA>SED>SEE. В результате серореактивность, например, SEE (стафилококкового энтеротоксина E) ниже, чем, например, SEA (стафилококкового энтеротоксина A). Исходя из этих данных, специалист в данной области может предпочесть введение суперантигена с низким титром, такого как, например, SEE, вместо суперантигена с высоким титром, такого как, например, SEB (стафилококковый энтеротоксин B). Однако, как было также обнаружено, различные суперантигены обладают разными свойствами активации Т-клеток по сравнению друг с другом, и в случае суперантигенов дикого типа, лучшие активирующие Т-клетки суперантигены также часто обладают нежелательно высокой серореактивностью.

[0096] Эти относительные титры иногда соответствуют потенциальным проблемам, связанным с серореактивностью, таким как проблемы с нейтрализующими антителами. Таким образом, использование суперантигена с низким титром, такого как SEA или SEE, может быть полезным для снижения или предотвращения серореактивности вводимых парентерально суперантигенов. Суперантиген с низким титром обладают низкой серореактивностью, измеряемой, например, по типичным антителам против суперантигена в общей популяции. В некоторых случаях он также может обладать низкой иммуногенностью. Такие суперантигены с низким титром могут быть модифицированы с сохранением их низкого титра, как описано в настоящем документе.

[0097] Подходы к модификации суперантигенов могут использоваться для создания суперантигенов, которые обладают как требуемыми свойствами активации Т-клеток, так и сниженной серореактивностью, а в некоторых случаях также сниженной иммуногенностью. Принимая во внимание, что некоторые области гомологии между суперантигенами относятся к серореактивности, можно создать рекомбинантный суперантиген, который будет вызывать требуемую активацию Т-клеток и обладать нужной серореактивностью и/или иммуногенностью. Кроме того, белковые последовательности и иммунологическая перекрестная реактивность суперантигенов или стафилококковых энтеротоксинов делятся на две родственные группы. Одна группа состоит из SEA, SEE и SED. Вторая группа включает SPEA, SEC и SEB. Таким образом, можно выбрать суперантигены с низким титром для уменьшения или устранения перекрестной реактивности с высокими титрами или эндогенными антителами, направленными против стафилококковых энтеротоксинов.

[0098] Области в суперантигенах, которые, как считают, влияют на серореактивность, включают, например, область А, которая включает аминокислотные остатки 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27; область В, которая включает аминокислотные остатки 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49; область С, которая включает аминокислотные остатки 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 и 84; область D, которая включает аминокислотные остатки 187, 188, 189 и 190; и область E, которая включает аминокислотные остатки 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226 и 227 (см., патент США 7,125,554 и **ФИГУРУ 2** в настоящем документе). Таким образом, предполагается, что эти области могут быть подвергнуты мутации, например, путем

замены аминокислоты, с получением суперантигена, обладающего измененной серореактивностью.

[0099] Полипептидные или аминокислотные последовательности для перечисленных выше суперантигенов могут быть получены из любого банка данных последовательностей, например, из банка данных белковых структур и/или GenBank. Примерные номера доступа в GenBank включают, без ограничения ими, SEE - P12993; SEA - P013163; SEB - P01552; SEC1 - P01553; SED - P20723; и SEN - AAA19777.

[00100] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2) может быть модифицирована таким образом, что аминокислоты в любой из идентифицированных областей А-Е (см. **ФИГУРУ 2**) заменяют другими аминокислотами. Такие замены включают, например, K79, K81, K83 и D227 или K79, K81, K83, K84 и D227, или, например, K79E, K81E, K83S и D227S, или K79E, K81E, K83S, K84S и D227A. В некоторых вариантах осуществления суперантигеном является SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3; см. также патент США 7,125,554) или SEAD227A (SEQ ID NO: 4; см. также патент США 7,226,601).

1. Модифицированные полинуклеотиды и полипептиды

[00101] Биологический функциональный эквивалент полинуклеотида, кодирующего природный или референсный суперантиген, может включать полинуклеотид, который был сконструирован таким образом, что он содержит определенные последовательности, сохраняя при этом способность кодировать природный или референсный суперантиген. Это может быть достигнуто благодаря вырожденности генетического кода, то есть присутствия нескольких кодонов, которые кодируют одну и ту же аминокислоту. В одном примере в полинуклеотид можно ввести последовательность распознавания эндонуклеазы рестрикции, не нарушая при этом способность такого полинуклеотида кодировать белок. Другие полинуклеотидные последовательности могут кодировать суперантигены, которые отличаются, но функционально являются по существу эквивалентными, по меньшей мере по одному биологическому свойству или активности (например, обладают по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% биологического свойства или активности, например, без ограничения, способности индуцировать Т-клеточный ответ, который приводит к цитотоксичности в отношении опухолевых клеток), референсному суперантигену.

[00102] В другом примере полинуклеотид может представлять собой (и кодировать) суперантиген, функционально эквивалентный референсному суперантигену, даже в том случае, если он может содержать более значимые изменения. Некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в белковой структуре, без заметной потери способности к связыванию при взаимодействии со структурами, такими как, например, антигенсвязывающие области антител, участки связывания на молекулах субстрата, рецепторы и т.п. Более того, консервативные аминокислотные замены не могут нарушать биологическую активность белка, поскольку происходящие в результате

структурные изменения часто не оказывают влияния на способность белка выполнять свою предполагаемую функцию. Таким образом, предполагается, что в последовательность генов и белков, раскрытых в настоящем документе, могут быть внесены различные изменения при одновременном выполнении целей настоящего изобретения.

[00103] Аминокислотные замены могут быть введены для использования преимущества относительного подобия боковой цепи аминокислотных заместителей, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и/или т.п. Анализ размера, формы и/или типа боковой цепи аминокислотных заместителей показывает, что все остатки аргинина, лизина и/или гистидина являются положительно заряженными остатками; что аланин, глицин и/или серин имеют одинаковый размер; и/или что фенилаланин, триптофан и/или тирозин имеют в целом подобную форму. Таким образом, исходя из этих соображений, аргинин, лизин и/или гистидин; аланин, глицин и/или серин; и/или фенилаланин, триптофан и/или тирозин; определены в настоящем документе как биологически функциональные эквиваленты. Кроме того, допускается введение неприродных аминокислот. Подходы к введению аминокислотных замен другими природными и неприродными аминокислотами описаны в патенте США 7,763,253.

[00104] В отношении функциональных эквивалентов, следует понимать, что в определении "биологически функционального эквивалента" белка и/или полинуклеотида подразумевается концепция, согласно которой в определенную часть молекулы может быть внесено ограниченное количество изменений, при котором возможно сохранение молекулы с приемлемым уровнем эквивалентной биологической активности. Таким образом, биологически функциональными эквивалентами считаются такие белки (и полинуклеотиды), в которых выбранные аминокислоты (или кодоны) могут быть заменены без существенного влияния на биологическую функцию. Функциональная активность включает индукцию Т-клеточного ответа, который приводит к цитотоксическому воздействию на опухолевые клетки.

[00105] Кроме того, предполагается, что модифицированный суперантиген может быть создан путем замены гомологичных областей различных белков посредством "замены доменов", которая включает создание химерных молекул с использованием различных, но в данном случае родственных полипептидов. При сравнении различных суперантигенных белков для идентификации функционально близких областей этих молекул (см., например, **ФИГУРУ 2**), можно заменить родственные домены этих молекул, чтобы определить важность этих областей для функции суперантигена. Эти молекулы могут иметь дополнительную ценность, поскольку такие "химеры" можно отличить от природных молекул, и при этом вероятно, что они смогут выполнять такую же функцию.

[00106] В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности референсного суперантигена,

выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, где суперантиген необязательно сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70% 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% биологической активности или свойств референсного суперантигена.

[00107] В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей суперантиген, выбранный из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, где суперантиген необязательно сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70% 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% биологической активности или свойств референсного суперантигена.

[00108] Идентичность последовательности может быть определена различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, при использовании общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (от англ. Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания) с использованием алгоритма, используемого в программах blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Karlin et al., (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:2264-2268; Altschul, (1993) J. MOL. EVOL. 36, 290-300; Altschul et al., (1997) NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402, включенные посредством отсылки), предназначен для поиска подобия последовательностей. По поводу обсуждения основных вопросов при поиске в базах данных последовательностей см. публикацию Altschul et al., (1994) NATURE GENETICS 6:119-129, которая полностью включена посредством отсылки. Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для получения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описаний, сопоставлений, ожидаемого (т.е. порога статистической значимости для регистрации совпадений с последовательностями в базе данных), предельного значения, матрицы и фильтра установлены по умолчанию. Матрица замен по умолчанию, используемая в blastp, blastx, tblastn и tblastx, является матрицей BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919, полностью включенная посредством отсылки). Четыре параметра blastn могут быть настроены следующим образом: Q=10 (штраф за создание пропуска); R=10 (штраф за продление пропуска); wink=1 (генерирует совпадения слов в каждой wink^{OM} позиции запрашиваемой последовательности); и gapw=16 (задает ширину окна, в котором генерируются выравнивания с пропусками). Эквивалентные значения параметра Blastp могут быть Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Поиск также можно проводить с использованием параметра расширенной опции BLAST NCBI (Национального центра биотехнологической информации США) (например: -G, штраф за введение пропуска [целое число]: по умолчанию=5 для нуклеотидов/11 для белков; -E, штраф за продолжение пропуска [целое число]: по умолчанию=2 для нуклеотидов/1 для белков; -q, штраф за несовпадение

нуклеотида [целое число]: по умолчанию=-3; -r, премия за совпадение нуклеотида [целое число]: по умолчанию=1; -e, ожидаемое значение [Real]: по умолчанию=10; -W, размер слова [целое число]: по умолчанию=11 для нуклеотидов/ 28 для мегабластов/3 для белков; -y, снижение (X) для расширений blast в битах: по умолчанию=20 для blastn/7 для других; -X, значение снижения X для выравнивания с пропусками (в битах): по умолчанию=15 для всех программ, не применимо к blastn; и -Z, окончательное значение снижения X для выравнивания с пропусками (в битах): 50 для blastn, 25 для других). Также может использоваться ClustalW для парного выравнивания белков (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosom62 и штраф за введение пропуска=10, и штраф за продление пропуска=0,1). В сравнении Bestfit между последовательностями, доступное в пакете GCG версии 10.0 используются параметры для ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за продление пропуска), и эквивалентные параметры при сравнении белков - GAP=8 и LEN=2.

С. Направленные суперантигены

[00109] Для повышения специфичности суперантиген предпочтительно конъюгируют с направляющим фрагментом для создания направленного конъюгата суперантигена, который связывает антиген, предпочтительно экспрессируемый раковой клеткой, например антиген клеточной поверхности, такой как 5T4. Направляющая составляющая представляет собой носитель, который может использоваться для связывания суперантигена с раковыми клетками, например, с поверхностью раковых клеток. Направленный конъюгат суперантигена должен сохранять способность активировать большие количества Т-лимфоцитов. Например, направленный конъюгат суперантигена должен активировать большие количества Т-клеток и направлять их в ткани, содержащие опухолеассоциированный антиген, связанный с направляющим фрагментом. В таких ситуациях специфические клетки-мишени избирательно уничтожаются, при этом остальная часть организма остается относительно невредимой. Этот тип терапии предпочтителен, поскольку неспецифические противоопухолевые средства, такие как цитостатические химиотерапевтические средства, являются неспецифическими и убивают большие количества клеток, не ассоциированных с опухолями, подлежащими лечению. Например, исследования направленных конъюгатов суперантигенов показали, что воспаление с инфильтрацией цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) в опухолевую ткань быстро усиливается в ответ на первую инъекцию направленного суперантигена (Dohlsten et al. (1995) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 92:9791-9795). Это воспаление с инфильтрацией CTL в опухоль является одним из основных эффекторов противоопухолевого терапевтического средства на основе направленных суперантигенов.

[00110] Опухолонаправленные суперантигены представляют собой иммунотерапию против рака и являются терапевтическими слитыми белками, содержащими направляющий фрагмент, конъюгированный с суперантигеном (Dohlsten et al. (1991) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 88:9287-9291; Dohlsten et al. (1994) PROC.

NATL. ACAD. SCI. USA 91:8945-8949).

[00111] Направляющий фрагмент в принципе может быть любой структурой, которая способна связываться с клеточной молекулой, например, молекулой клеточной поверхности, и предпочтительно представляет собой специфическую для заболевания молекулу. Молекула-мишень (например, антиген), против которой направлен направляющий фрагмент, обычно отличается от: (а) эпитопа V β -цепи, с которым связывается суперантиген, и (b) эпитопов МНС класса II, с которыми связываются суперантигены. Направляющий фрагмент может быть выбран из антител, в том числе их антигенсвязывающих фрагментов, растворимых Т-клеточных рецепторов, факторов роста, интерлейкинов (например, интерлейкина-2), гормонов и т.д.

[00112] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело (например, Fab, F(ab)₂, Fv, одноцепочечное антитело и т.д.). Антитела являются крайне универсальными и полезными клеточно-специфичными направляющими фрагментами, поскольку они обычно могут быть созданы против любого представляющего интерес антигена клеточной поверхности. Моноклональные антитела были созданы против рецепторов клеточной поверхности, опухолеассоциированных антигенов и лейкоцитарных линиеспецифических маркеров, таких как CD-антигены. Гены вариабельной области антитела могут быть легко выделены из клеток гибридомы способами, хорошо известными в данной области. Примеры опухолеассоциированных антигенов, которые могут использоваться для получения направляющего фрагмента, могут включать, без ограничения перечисленными, gp100, Melan-A/MART, MAGE-A, MAGE (антиген меланомы E), MAGE-3, MAGE-4, MAGEA3, тирозиназу, TRP2, NY-ESO-1, РЭА (раково-эмбриональный антиген), PSA, p53, маммаглобин-A, сурвивин, MUC1 (муцин1)/DF3, металлопанстимулин-1 (MPS-1), цитохрома P450 изоформы 1B1, 90K/Mac-2 связывающий белок, Ер-CAM (МК-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, LAGE-1/CAMEL, TAGE-1, GAGE, 5T4, gp70, SCP-1, c-мус, циклин B1, MDM2, p62, Кос, IMP1, RCAS1, TA90, OA1, CT-7, HOM-MEL-40/SSX-2, SSX-1, SSX-4, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HDAC5, MBD2, TRIP4, NY-CO-45, KNSL6, HIP1R, Seb4D, KIAA1416, IMP1, 90K/Mac-2 связывающий белок, MDM2, NY/ESO, EGFRvIII, IL-13R α 2, HER2, GD2, EGFR, PDL1, мезотелин, PCMA, TGF β RDN, LMP1, GPC3, Fra, MG7, CD133, CMET, PSCA, глипикан 3, ROR1, NKR-2, CD70 и LMNA.

[00113] Примеры опухоленаправляющих антител могут включать, без ограничения перечисленными, антитела против CD19, антитела против CD20, антитела против 5T4, антитела против Ер-CAM, антитела против Her-2/неу, антитела против EGFR, антитела против РЭА, антитела против простатического специфического мембранного антигена (PCMA) и антитела против IGF-1R. Следует понимать, что суперантиген может быть конъюгирован с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см. WO8907947) или C242Fab (см. WO9301303).

[00114] Примеры опухоленаправленных суперантигенов, которые могут применяться в настоящем изобретении, включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-

SEA_{D227A} (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7, см. **ФИГУРУ 2** и **ФИГУРУ 3**).

[00115] В предпочтительном варианте осуществления предпочтительным конъюгатом является конъюгат суперантигена, известный как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], который представляет собой слитый белок Fab-фрагмента антитела против 5T4 и суперантигена SEA/E-120. Наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®] включает две белковых цепи, которые в совокупности включают рекомбинантный суперантиген стафилококкового энтеротоксина (SEA/E-120) и направляющий Fab 5T4, включающий модифицированные последовательности вариабельной области 5T4, слитые с последовательностями константной области мышиного IgG1/κ-антитела C242. Первая белковая цепь включает остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 (см. также SEQ ID NO: 8) и включает тяжелую цепь химерного Fab 5T4, соответствующую остаткам 1-222 SEQ ID NO: 7, и суперантиген SEA/E-120, соответствующий остаткам 226-458 SEQ ID NO: 7, ковалентно связанный через трипептидный линкер GGP, соответствующий остаткам 223-225 SEQ ID NO: 7. Вторая цепь включает остатки 459-672 SEQ ID NO: 7 (см. также SEQ ID NO: 9) и включает легкую цепь химерного Fab 5T4. Две белковые цепи удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями между тяжелой и легкой цепями Fab. Остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 соответствуют остаткам 1-458 SEQ ID NO: 8, и остатки 459-672 SEQ ID NO: 7 соответствуют остаткам 1-214 SEQ ID NO: 9. Наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®] включает белки SEQ ID NO: 8 и 9, удерживаемые вместе нековалентными взаимодействиями между тяжелой и легкой цепями Fab. Наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®] индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток при концентрациях примерно 10 пМ, и суперантигенный компонент конъюгата был разработан так, чтобы иметь низкое связывание с человеческими антителами и МНС класса II.

[00116] Предполагается, что другие направляющие фрагменты на основе антител могут быть сконструированы, модифицированы, экспрессированы и очищены с помощью методов, известных в уровне техники и более подробно обсуждаемых ниже.

[00117] Другой тип направляющего фрагмента включает растворимый Т-клеточный рецептор (TCR). Некоторые формы растворимых TCR-рецепторов могут содержать либо только внеклеточные домены, либо внеклеточные и цитоплазматические домены. Также могут быть предусмотрены другие модификации TCR для получения растворимого TCR, в котором трансмембранные домены были удалены и/или изменены таким образом, что TCR не будет мембраносвязанным, как описано в публикациях заявок на патент США US 2002/119149, US 2002/0142389, US 2003/0144474 и US 2003/0175212 и международных публикациях WO2003020763; WO9960120 и WO9960119.

[00118] Направляющий фрагмент может быть конъюгирован с суперантигеном либо при использовании рекомбинантных технологий, либо путем химического соединения направляющего фрагмента с суперантигеном.

1. Рекомбинантный линкер (слитый белок)

[00119] Предполагается, что ген, кодирующий суперантиген, соединен напрямую или ненапрямую (например, через линкер, содержащий аминокислоту) с направляющим фрагментом, может быть создан и экспрессирован с применением стандартных технологий рекомбинантных ДНК. Например, N-конец модифицированного суперантигена может быть соединен с С-концом направляющего фрагмента или наоборот. В случае антител или фрагментов антител, которые могут служить в качестве направляющих фрагментов, для создания слитого белка может использоваться легкая или тяжелая цепь. Например, в случае Fab-фрагмента N-конец модифицированного суперантигена может быть соединен с первым константным доменом тяжелой цепи антитела (CH₁). В некоторых случаях модифицированный суперантиген может быть соединен с Fab-фрагментом путем соединения VH и VL домена с суперантигеном. В альтернативе пептидный линкер может использоваться для соединения суперантигена и направляющего фрагмента друг с другом. В случае использования линкера, линкер предпочтительно содержит гидрофильные аминокислотные остатки, такие как Gln, Ser, Gly, Glu, Pro, His и Arg. Предпочтительные линкеры представляют собой пептидные мостики, состоящие из 1-10 аминокислотных остатков, более конкретно, 3-7 аминокислотных остатков. Примером линкера является трипептид -GlyGlyPro-. Такие подходы успешно использовали при создании и производстве конъюгата суперантигена, наптумомаба эстафенатокса/ANYARA[®].

2. Химическая связь

[00120] Также предполагается, что суперантиген может быть связан с направляющим фрагментом химической связью. Для химического связывания суперантигена с направляющим фрагментом может потребоваться линкер, например пептидный линкер. Пептидный линкер предпочтительно является гидрофильным и содержит одну или больше реакционноспособных групп, выбранных из амидов, тиоэфиров, дисульфидов и т.д. (см. патенты США 5,858,363, 6,197,299 и 6,514,498). Также предполагается, что для химического связывания могут использоваться гомо- или гетеробифункциональные сшивающие реагенты. При химическом связывании суперантигена с направляющим фрагментом часто используются функциональные группы (например, первичные аминогруппы или карбоксильные группы), которые присутствуют в соединениях во многих положениях.

D. Экспрессия суперантигенов и конъюгаты суперантигенов

[00121] При использовании технологий рекомбинантных ДНК, суперантиген или конъюгат суперантигена-направляющего фрагмента можно экспрессировать с применением стандартных векторов экспрессии и систем экспрессии. Векторы экспрессии, которые были генетически сконструированы, чтобы содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую суперантиген, вводят (например, трансфицируют) в клетки-хозяева для получения суперантигена (см., например, Dohlsten et al. (1994), Forsberg et al. (1997) J. BIOL. CHEM. 272:12430-12436, Erlandsson et al. (2003) J. MOL. BIOL. 333:893-905 и WO2003002143).

[00122] Клетки-хозяева могут быть генетически модифицированы, например, с применением технологий трансформации или трансфекции, для включения последовательностей нуклеиновых кислот и экспрессии суперантигена. Введение последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-хозяина можно выполнить путем трансфекции с фосфатом кальция, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции, микроинъекции, опосредованной катионными липидами трансфекции, электропорации, трансдукции, введения при соскабливании, баллистического введения, инфицирования или других методов. Такие методы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Davis et al. (1986) BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY и Sambrook, et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

[00123] Репрезентативные примеры подходящих клеток-хозяев включают бактериальные клетки, такие как стрептококки, стафилококки, клетки *E. coli*, *Streptomyces* и *Bacillus subtilis*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки и клетки аспергилл; клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9; клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK-293 и меланомы Bowes.

[00124] Примеры систем для продукции суперантигенов можно найти, например, в патенте США 6,962,694.

Е. Очистка белка

[00125] Конъюгаты суперантигена и/или суперантигена-направляющего фрагмента перед применением предпочтительно подвергают очистке, которая может быть выполнена при использовании различных протоколов очистки. После отделения конъюгата суперантигена или суперантигена-направляющего фрагмента от других белков, представляющий интерес белок может быть дополнительно очищен с помощью хроматографических и электрофоретических методов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические методы, особенно подходящие для получения чистого пептида, включают ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; аффинную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическое фокусирование. Термин "очищенный" при использовании в настоящем документе используется для обозначения композиции, отделяемой от других компонентов, в которой представляющая интерес макромолекула (например, белок) очищена до любой степени по сравнению с ее исходным состоянием. Обычно термин "очищенный" относится к макромолекуле, которая была подвергнута фракционированию с удалением различных других компонентов и которая по существу сохраняет свою биологическую активность. Термин "по существу очищенный" относится к композиции, в которой представляющая интерес макромолекула представляет основной компонент композиции, например, составляет приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или больше от содержания композиции.

[00126] Специалистам в данной области известны различные способы

количественного определения степени очистки белка, включающие, например, определение удельной активности активной фракции и оценку количества данного белка во фракции с помощью анализа методом электрофореза в ДСН-ПААГ, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или любого другого метода фракционирования. Различные методики, подходящие для использования при очистке белка, включают, например, осаждение сульфатом аммония, ПЭГ, антителами и т.п. или денатурацию при нагревании с последующим центрифугированием; стадии хроматографии, такие как ионный обмен, гель-фильтрация, обращенная фаза, гидроксиапатит, аффинная хроматография; изоэлектрическое фокусирование; гель-электрофорез; и комбинации таких и других методик. Предполагается, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен, или что некоторые стадии могут быть исключены, и все-таки это приведет к подходящему способу получения по существу очищенного белка или пептида.

III. Иммунопотенциатор

[00127] Предусмотрено, что в некоторых вариантах осуществления эффективность конъюгата суперантигена может быть повышена путем введения конъюгата суперантигена субъекту, подлежащему лечению, вместе с иммунопотенциатором.

[00128] В некоторых вариантах осуществления примерные иммунопотенциаторы могут: (a) стимулировать активирующую сигнализацию Т-клеток, (b) подавлять ингибирующую сигнализацию Т-клеток между злокачественными клетками и Т-клеткой, (c) подавлять ингибирующую сигнализацию, что приводит к экспансии, активации и/или активности Т-клеток по пути иммунного ответа, опосредованного не IgG1 человека, например, пути, опосредованному иммуноглобулином IgG4 человека, (d) комбинация (a) и (b), (e) комбинация (a) и (c), (f) комбинация (b) и (c), и (g) комбинация (a), (b) и (c).

[00129] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор является ингибитором пути контрольной точки. На сегодняшний день идентифицирован ряд путей ингибирования контрольных точек Т-клеток, например, путь иммунной контрольной точки PD-1 и путь иммунной контрольной точки антигена цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4).

[00130] PD-1 представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности Т-клеток, который служит в качестве контрольной точки иммунной системы, которая ингибирует или иным образом модулирует активность Т-клеток в подходящее время для предотвращения гиперактивного иммунного ответа. Раковые клетки, тем не менее, могут воспользоваться этой контрольной точкой, экспрессируя лиганды, например PD-L1, PD-L2 и т.д., которые взаимодействуют с PD-1 на поверхности Т-клеток, выключая или модулируя активность Т-клеток. Используя такой подход, рак может ускользать от иммунного ответа, опосредуемого Т-клетками.

[00131] В пути CTLA-4 взаимодействие CTLA-4 на Т-клетке со своими лигандами (например, CD80, также известными как B7-1 и CD86) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (а не раковых клеток) приводит к ингибированию Т-

клеток. В результате лиганд, который ингибирует активацию или активность Т-клеток (например, CD80 или CD86), предоставляется антигенпрезентирующей клеткой (ключевым типом клеток в иммунной системе), а не раковой клеткой. Хотя связывание CTLA-4 и PD-1 оказывает сходное негативное воздействие на Т-клетки, момент снижения, ответственные механизмы сигнализации и анатомическая локализация иммунного ингибирования, вызванного этими двумя иммунными контрольными точками, различаются (American Journal of Clinical Oncology. Volume 39, Number 1, February 2016). В отличие от CTLA-4, который ограничен ранней фазой прайминга активации Т-клеток, PD-1 функционирует намного позже во время эффекторной фазы (Keir et al. (2008) ANNU. REV IMMUNOL., 26:677-704). CTLA-4 и PD-1 представляют собой два ингибирующих Т-клетки рецептора с независимыми, избыточными механизмами действия.

[00132] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор препятствует (полностью или частично) репрессии антигеном, экспрессируемым злокачественной клеткой, ингибирующей сигнализации Т-клеток между злокачественной клеткой и Т-клеткой. В одном варианте осуществления такой иммунопотенциатор является ингибитором контрольной точки, например, ингибитором на основе PD-1. Примеры таких иммунопотенциаторов включают, например, антитела против PD-1, антитела против PD-L1 и антитела против PD-L2.

[00133] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена вводят с ингибитором на основе PD-1. Ингибитор на основе PD-1 может включать: (i) ингибитор PD-1, то есть молекулу (например, антитело или малую молекулу), которая связывается с PD-1 на Т-клетке, препятствуя связыванию лиганда PD-1, экспрессируемого представляющей интерес раковой клеткой, и/или (ii) ингибитор PD-L, например ингибитор PD-L1 или PD-L2, т.е. молекулу (например, антитело или малую молекулу), которая связывается с лигандом PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2), препятствуя связыванию лиганда PD-1 с его когнатным PD-1 на Т-клетке.

[00134] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена вводят с ингибитором CTLA-4, например, антителом против CTLA-4. Примеры антител против CTLA-4 включают ипилимумаб и тремелиумаб.

[00135] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор препятствует (полностью или частично) репрессии антигеном, экспрессируемым раковой клеткой, экспансии, активации и/или активности Т-клеток по пути иммунного ответа, опосредованного IgG4 человека (не IgG1 человека), например, не через путь ADCC. Предполагается, что в таких вариантах осуществления, несмотря на то, что иммунный ответ, потенцируемый конъюгатом суперантигена и иммунопотенциатором, может включать некоторую активность ADCC, основной компонент(ы) иммунного ответа не включает активность ADCC. Напротив, некоторые антитела, которые в настоящее время применяются в иммунотерапии, такие как ипилимумаб (моноклональное IgG1-антитело против CTLA-4), могут уничтожать клетки-мишени посредством ADCC путем сигнализации посредством своего Fc-домена через Fc-рецепторы на эффекторных клетках.

Ипилимумаб, как и многие другие терапевтические антитела, был разработан как человеческий иммуноглобулин IgG1, и, несмотря на то, что ипилимумаб блокирует взаимодействия между CTLA-4 и CD80 или CD86, его механизм действия, как полагают, включает ADCC-элиминирование инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток, экспрессирующих высокий уровень CTLA-4 клеточной поверхности (Mahoney et al. (2015) NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY 14:561-584). Поскольку CTLA-4 экспрессируется на высоких уровнях в субпопуляции Т-клеток (регуляторных Т-клеток), которые осуществляют негативный контроль активации Т-клеток, то при введении IgG1-антитела против CTLA-4 количество регуляторных Т-клеток снижается посредством ADCC.

[00136] В некоторых вариантах осуществления желательно использовать иммунопотенциаторы, механизм действия которых заключается преимущественно в блокировании передачи ингибирующих сигналов между раковыми клетками и Т-клетками без значительного истощения популяций Т-клеток (например, позволяя популяциям Т-клеток увеличиваться). С этой целью желательно использовать антитело, например антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против PD-L2, которое имеет изотип IgG4 человека или основано на нем. Изотип IgG4 человека предпочтителен в определенных обстоятельствах, поскольку этот изотип антитела вызывает низкую активность ADCC или не вызывает ее вообще по сравнению с изотипом IgG1 человека (Mahoney et al. (2015) выше). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор, например антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против PD-L2, имеет или основано на изотипе IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, для которого не было известно истощение Тreg-клеток, например, антитела IgG4, направленные другие контрольные точки кроме CTLA-4 (например, IgG4-ингибиторы против PD-1).

[00137] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, которое имеет или основано на изотипе IgG1 человека или другом изотипе, который вызывает антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементопосредованную цитотоксичность (CDC). В других вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, которое имеет или основано на изотипе IgG4 человека или другом изотипе, который вызывает низкую антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементопосредованную цитотоксичность (CDC) или не вызывает ее.

[00138] Примеры ингибиторов на основе PD-1 описаны в патентах США 8,728,474, 8,952,136 и 9,073,994 и патенте EP 1537878B1. Примеры антител против PD-1 включают ниволумаб (Опдиво[®], Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Китруда[®], Merck), цемиплимаб (Либтайо[®], Regeneron/Sanofi), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), пидилизумаб (CT-011), достарлимаб, синтилимаб, торипалимаб, камрелизумаб, тислелизумаб и пролголимаб. Примеры антител против PD-L1 включают авелумаб (Бавенсио[®], EMD Serono/Pfizer), атезолизумаб (Тецентрик[®], Genentech) и дурвалумаб

(Имфинзи[®], Medimmune/AstraZeneca).

[00139] Ингибитор на основе PD-1 может быть разработан, экспрессирован и очищен с применением способов, известных специалистам в данной области, например, как описано выше. Антитела против PD-1 могут быть разработаны, экспрессированы, очищены, включены в состав и введены, как описано в патентах США 8,728,474, 8,952,136 и 9,073,994.

[00140] Другие иммунопотенциаторы (например, антитела и различные малые молекулы) могут направленно воздействовать на сигнальные пути, включающие один или больше из следующих лигандов: B7-H3 (обнаружен, помимо прочего, на клетках предстательной железы, клетках почек, немелкоклеточных легких, поджелудочной железы, желудка, яичников, колоректальных клетках); B7-H4 (обнаружен, помимо прочего, на клетках молочной железы, почек, яичников, поджелудочной железы, меланомы); HHLA2 (обнаружен, помимо прочего, на клетках молочной железы, легких, щитовидной железы, меланомы, поджелудочной железы, яичников, печени, мочевого пузыря, толстой кишки, предстательной железы, почек); галектины (обнаружены, помимо прочего, на клетках немелкоклеточных легких, колоректальных клетках и клетках желудка); CD30 (обнаружен, помимо прочего, на клетках лимфомы Ходжкина, крупноклеточной лимфомы); CD70 (обнаружен, помимо прочего, на клетках неходжкинской лимфомы, почек); ICOSL (обнаружен, помимо прочего, на клетках глиобластомы, меланомы); CD155 (обнаружен, помимо прочего, на клетках почек, предстательной железы, поджелудочной железы, глиобластомы); и TIM3. Аналогичным образом, другие потенциальные иммунопотенциаторы, которые могут использоваться, включают, например, агонист 4-1BB (CD137) (например, полностью человеческое IgG4 антитело против CD137 урелумаб/BMS-663513), ингибитор LAG3 (например, гуманизированное IgG4 антитело против LAG3 LAG525, Novartis); ингибитор IDO (например, малая молекула INCB024360, Incyte Corporation), ингибитор TGF β (например, малая молекула галунисертиб, Eli Lilly) и другие рецепторы или лиганды, которые присутствуют на Т-клетках и/или опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциаторы (например, антитела и различные малые молекулы), которые специфично воздействуют на сигнальные пути, включающие один или больше из вышеуказанных лигандов, поддаются фармацевтическому вмешательству на основе взаимодействий агонистов/антагонистов, но не посредством ADCC.

А. Получение антител

[00141] Способы получения антител известны в уровне техники. Например, молекулы ДНК, кодирующие переменные области легкой цепи и переменные области тяжелой цепи, могут быть химически синтезированы при использовании последовательностей CDR и переменных областей антител, представляющих интерес, например, последовательностей антител, представленных в патенте США 8,952,136, и депонированных гибридом, описанных в патенте США 9,073,994. Молекулы синтетической ДНК могут быть лигированы с другими подходящими нуклеотидными

последовательностями, включая, например, последовательности, кодирующие константную область, и последовательности регуляции экспрессии, для получения обычных конструкций для экспрессии генов, кодирующих нужные антитела. Получение определенных генетических конструкций находится в рамках компетенции средних специалистов в данной области техники. В альтернативе, последовательности, представленные в настоящем документе, могут быть клонированы из гибридом с применением стандартных методов гибридизации или методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических зондов нуклеиновых кислот, последовательности которых основаны на информации о последовательности, представленной в настоящем документе, или информации о последовательностях из предшествующего уровня техники, которая касается генов, кодирующих тяжелые и легкие цепи мышиных антител в клетках гибридом.

[00142] Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть включены (лигированы) в векторы экспрессии, которые могут быть введены в клетки-хозяева путем стандартных методов трансфекции или трансформации. Примерами клеток-хозяев являются клетки *E. coli*, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек новорожденного хомячка (ВНК), клетки почек обезьян (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2) и клетки миеломы, которые в иных условиях не продуцируют IgG белок. Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в условиях, которые позволяют клеткам-хозяевам экспрессировать гены, кодирующие переменные области легкой и/или тяжелой цепи иммуноглобулина.

[00143] Конкретные условия экспрессии и очистки будут изменяться в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, если ген нужно экспрессировать в *E. coli*, его сначала клонируют в вектор экспрессии, помещая рекомбинантный ген после подходящего бактериального промотора, например, T_{tr} или T_{ac}, и прокариотической сигнальной последовательности. Экспрессируемый секретируемый белок накапливается в преломляющих тельцах или тельцах включения, и его можно собирать после разрушения клеток с помощью френч-пресса или обработки ультразвуком. Затем преломляющие тела солибилизируют, а белки подвергают рефолдингу и расщеплению способами, известными в данной области.

[00144] Если конструкцию ДНК, кодирующую антитело, раскрытое в настоящем документе, нужно экспрессировать в эукариотических клетках-хозяевах, например, в клетках CHO, ее сначала встраивают в вектор экспрессии, содержащий подходящий эукариотический промотор, сигнал секреции, энхансеры IgG и различные интроны. Такой вектор экспрессии необязательно содержит последовательности, кодирующие всю или часть константной области, позволяющие экспрессировать всю или часть тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления один экспрессирующий вектор содержит переменные области и тяжелой, и легкой цепи, которые нужно экспрессировать.

[00145] Генетические конструкции могут вводить в эукариотические клетки-хозяева с помощью стандартных методик. Клетки-хозяева экспрессируют V_L или V_H фрагменты, гетеродимеры V_L - V_H , одноцепочечные полипептиды V_H - V_L или V_L - V_H , полноразмерные тяжелые или легкие цепи иммуноглобулинов или их части, каждая из которых может быть присоединена к фрагменту, выполняющему другую функцию (например, цитотоксическое действие). В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина трансфицируют одним вектором, экспрессирующим полипептид, экспрессирующий всю или часть тяжелой цепи (например, переменную область тяжелой цепи) или легкой цепи (например, переменную область легкой цепи). В других вариантах осуществления клетку-хозяина трансфицируют одним вектором, кодирующим: (а) полипептид, включающий переменную область тяжелой цепи, и полипептид, включающий переменную область легкой цепи, или (б) всю тяжелую цепь иммуноглобулина и всю легкую цепь иммуноглобулина. В других вариантах осуществления клетку-хозяина совместно трансфицируют больше чем одним вектором экспрессии (например, одним вектором экспрессии, экспрессирующим полипептид, включающий всю или часть тяжелой цепи или переменной области тяжелой цепи, и другим вектором экспрессии, экспрессирующим полипептид, включающий всю или часть легкой цепи или переменной области легкой цепи).

[00146] Способ получения полипептида, включающего переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, или полипептида, включающего переменную область легкой цепи иммуноглобулина, может включать выращивание (культивирование) клетки-хозяина, трансфицированной вектором экспрессии, в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида, включающего переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, или полипептида, включающего переменную область легкой цепи иммуноглобулина. Затем полипептид, включающий переменную область тяжелой цепи, или полипептид, включающий переменную область легкой цепи, может быть очищен с помощью методов, хорошо известных в данной области, например, аффинных меток, таких как глутатион-S-трансфераза (GST) и гистидиновые метки.

[00147] Способ получения моноклонального антитела, связывающего белок-мишень, например PD-1, PD-L1 или PD-L2, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, может включать выращивание клетки-хозяина, трансфицированной: (а) вектором экспрессии, который кодирует полноразмерную или неполную тяжелую цепь иммуноглобулина, и отдельным вектором экспрессии, кодирующим полноразмерную или неполную легкую цепь иммуноглобулина; или (б) одним вектором экспрессии, кодирующим обе цепи (например, полноразмерные или неполные цепи), в условиях, которые обеспечивают экспрессию обеих цепей. Интактное антитело (или антигенсвязывающий фрагмент) может быть получено и очищено при использовании методов, известных в уровне техники, например, белка А, белка G, аффинных меток, таких как глутатион-S-трансфераза (GST) и гистидиновые метки. Среднему специалисту в данной области хорошо известно, как экспрессировать тяжелую цепь и легкую цепь с

одного вектора экспрессии или с двух отдельных векторов экспрессии.

В. Модификации антител

[00148] Способы снижения или устранения антигенности антител и фрагментов антител известны в уровне техники. В случае, когда антитела необходимо ввести человеку, антитела предпочтительно являются "гуманизированными" для снижения или устранения антигенности у человека. Предпочтительно гуманизированное антитело имеет такую же или почти такую же аффинность к антигену, как и негуманизированное мышинное антитело, из которого оно было получено.

[00149] В одном методе гуманизации создают химерные белки, в которых константные области иммуноглобулина мыши заменяют константными областями иммуноглобулина человека. См., например, Morrison et al. (1984) PROC. NAT. ACAD. SCI. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) NATURE 312:604-608; патенты США 6,893,625 (Robinson); 5,500,362 (Robinson); и 4,816,567 (Cabilly).

[00150] В методе, известном как CDR-графтинг, CDR-области переменных областей легкой и тяжелой цепей перевивают в каркасные области из другого биологического вида. Например, мышинные CDR-области можно перевивать в человеческие FR-области. В некоторых вариантах осуществления CDR-области переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела против ErbB3 перевивают на FR-области человека или консенсусные FR-области человека. Для создания консенсусных FR-областей человека, FR-области из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой или легкой цепи человека выравнивают для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. CDR-графтинг описан в патентах США 7,022,500 (Queen); 6,982,321 (Winter); 6,180,370 (Queen); 6,054,297 (Carter); 5,693,762 (Queen); 5,859,205 (Adair); 5,693,761 (Queen); 5,565,332 (Hoogenboom); 5,585,089 (Queen); 5,530,101 (Queen); Jones et al. (1986) NATURE 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) NATURE 332: 323-327; Verhoeven et al. (1988) SCIENCE 239: 1534-1536; и Winter (1998) FEBS LETT 430: 92-94.

[00151] В подходе, называемом "супергуманизация" (SUPERHUMANIZATIONTM), последовательности CDR-областей человека выбирают из генов зародышевой линии человека по наличию структурного подобия CDR-областей человека с CDR-областями из антител мыши, подлежащих гуманизации. См., например, патент США 6,881,557 (Foote); и Tan et al. (2002) J. IMMUNOL. 169:1119-1125.

[00152] Другие методы снижения иммуногенности включают "реконструирование", "гиперхимеризацию" и "винирование/поверхностную перекладку". См., например, Vaswami et al. (1998) ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOL. 81:105; Roguska et al. (1996) PROT. ENGINEER 9:895-904; и Патент США 6,072,035 (Hardman). В подходе винирования/поверхностной перекладки доступные поверхностные аминокислотные остатки в мышинном антителе заменяют аминокислотными остатками, которые чаще встречаются в тех же положениях в человеческом антителе. Такой тип перекладки поверхности антител описан, например, в патенте США 5,639,641 (Pedersen).

[00153] Другой подход к преобразованию мышинных антител в форму, пригодную для медицинского применения у человека, известен как технология ACTIVMAВ™ (Vaccinex, Inc, Rochester, NY), которая включает вектор на основе вируса коровьей оспы, для экспрессии антител в клетках млекопитающих. Как утверждается, при этом производятся высокие уровни комбинаторного разнообразия тяжелых и легких цепей IgG. См., например, патенты США 6,706,477 (Zauderer); 6,800,442 (Zauderer); и 6,872,518 (Zauderer).

[00154] Другим подходом для преобразования антитела мыши в форму, пригодную для применения у человека, является технология, коммерчески реализованная компанией KaloBios Pharmaceuticals, Inc (Palo Alto, CA). Эта технология включает применение данной компанией собственной библиотеки человеческих "акцепторов" для получения "эпитоп-фокусированной" библиотеки для отбора антител.

[00155] Другим подходом к модификации мышиногo антитела в форму, пригодную для медицинского применения у человека, является технология HUMAN ENGINEERING™, которую коммерчески реализовала компания XOMA (US) LLC. См., например, публикацию PCT WO 93/11794 и патенты США 5,766,886; 5,770,196; 5,821,123; и 5,869,619.

[00156] Любой подходящий подход, в том числе любой из вышеперечисленных подходов, можно использовать для снижения или устранения иммуногенности для человека антитела, включающего связывающий компонент конъюгата суперантигена, раскрытого в настоящем документе.

[00157] Способы получения мультиспецифичных антител известны в уровне техники. Мультиспецифичные антитела включают биспецифичные антитела. Биспецифичные антитела представляют собой антитела, которые обладают связывающими специфичностями по меньшей мере к двум различным эпитопам. Иллюстративные биспецифичные антитела связываются с двумя разными эпитопами представляющего интерес антигена. Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂ биспецифичные антитела и диатела), как описано, например, в Milstein et al., NATURE 305:537-539 (1983), WO 93/08829, Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991), WO 94/04690, Suresh et al. (1986) METHODS IN ENZYMOLOGY 121:210, WO96/27011, Brennan et al. (1985) SCIENCE 229: 81, Shalaby et al. (1992) J. EXP. MED. 175:217-225, Kostelny et al. (1992) J. IMMUNOL. 148(5):1547-1553, Hollinger et al. (1993) PNAS, 90:6444-6448, Gruber et al. (1994) J. IMMUNOL. 152:5368, Wu et al. (2007) NAT. BIOTECHNOL. 25(11):1290-1297, патентной публикации США 2007/0071675 и Bostrom et al., SCIENCE 323:1640-1644 (2009).

IV. Составы и фармацевтические композиции

[00158] Конъюгат суперантигена и необязательный иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут вводить субъекту для лечения рака, например, для замедления скорости роста раковых клеток, уменьшения распространения или количества

метастазов, уменьшения размера опухоли, подавления роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимуляцию иммунного ответа против раковых клеток или опухоли, предотвращение или подавление прогрессирования рака, например, по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100%. В альтернативе, конъюгат суперантигена и необязательный иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут вводить субъекту для лечения рака, например, для увеличения продолжительности жизни субъекта, страдающего раком, например, на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет или 10 лет. В альтернативе, конъюгат суперантигена и необязательный иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут вводить субъекту для лечения рака, например, для увеличения выживаемости субъекта при ремиссии после лечения рака, например, в течение 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет или 10 лет. В альтернативе, конъюгат суперантигена и необязательный иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут вводить субъекту для лечения рака, например, для предотвращения прогрессирования рака у субъекта после лечения рака, например, в течение 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет или 10 лет. В каждом подходе конъюгат суперантигена и иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут вводить субъекту вместе, последовательно или с интервалами.

[00159] Конъюгат суперантигена и иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, могут включать в состав отдельно или вместе с применением методик, известных специалистам в данной области. Например, для терапевтического применения конъюгат суперантигена и/или иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, объединяют с фармацевтически приемлемым носителем. При использовании в настоящем документе "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримо с разумным соотношением пользы/риска. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими компонентами составов и не вредным для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические вещества и вещества, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в данной области.

[00160] Фармацевтические композиции, содержащие суперантиген и/или иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, раскрытый в настоящем документе, могут быть предоставлены в одной лекарственной форме или разных лекарственных формах. Фармацевтическая композиция или композиции должны быть изготовлены так, чтобы они были совместимыми со своим предполагаемым путем

введения. Примерам путей введения являются внутривенные (в/в), внутримышечное, кожное, ингаляционное, чрескожное, наружное, чресслизистое и ректальное введение. В альтернативе, средства могут вводить локально, а не системно, например, путем инъекции средства или средств непосредственно в место действия, часто в виде состава депо или с замедленным высвобождением.

[00161] Подходящие составы могут быть изготовлены способами, хорошо известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты композиции, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как воду для инъекций, раствор хлорида натрия, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновую кислоту или бисульфит натрия; хелатообразователи, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и регуляторы тоничности, такие как хлорид натрия или декстрозу.

[00162] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Носитель должен быть стабильным в условиях изготовления и хранения, и должен быть предохранен от воздействия микроорганизмов. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), а также их подходящие смеси.

[00163] Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными. Стерилизация может быть выполнена, например, путем фильтрации через стерилизующие фильтрующие мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию фильтрованием могут проводить до или после лиофилизации и восстановления.

[00164] Конъюгат суперантигена и/или иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1, согласно настоящему изобретению может применяться отдельно или в сочетании с другими соединениями, такими как носители или другие терапевтические соединения. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают эффективное количество одного или больше конъюгатов суперантигенов и, необязательно, один или больше иммунопотенциаторов, например, ингибитор на основе PD-1, например антитело против PD-1, и может также содержать дополнительные вещества, растворенные или диспергированные в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы "фармацевтический" или "фармакологически приемлемый" относятся к веществам, например, композициям, которые не вызывают нежелательной, аллергической или другой неблагоприятной реакции при введении млекопитающему, такому как, например, человек. Изготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один конъюгат суперантигена и/или иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1, будет известно специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения, и как

представлено в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенном в настоящий документ посредством отсылки. Кроме того, в случае введения человеку следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как требует Служба Биологических Стандартов FDA.

[00165] В конкретном варианте осуществления изобретения композиции изобретения включают опухоленаправленный суперантиген в комбинации с ингибитором на основе PD-1. Такие комбинации включают, например, любой опухоленаправленный суперантиген и/или ингибитор на основе PD-1, как описано в настоящем документе.

[00166] В конкретном варианте осуществления изобретения опухоленаправленный суперантиген включает бактериальный суперантиген, включающий, без ограничения перечисленными, стафилококковый энтеротоксин (SE), экзотоксин *Streptococcus pyogenes* (SPE), токсин синдрома токсического шока *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE), конъюгированные с направляющим фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения композиции включают опухоленаправленные суперантигены, включающие суперантигены со следующими номерами доступа в Protein Data Bank и/или в GenBank, в том числе, но без ограничения, SEE - P12993; SEA - P013163; SEB - P01552; SEC1 - P01553; SED - P20723; и SEH - AAA19777, а также их варианты, конъюгированные с направляющим фрагментом.

[00167] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена включает последовательность суперантигена дикого типа или рекомбинантного суперантигена, такую как, последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2), любая из которых может быть модифицирована таким образом, что аминокислоты в любой из идентифицированных областей А-Е (см. **ФИГУРУ 2**) заменены другими аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления суперантигеном, включенным в конъюгат, является SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3) или SEAD227A (SEQ ID NO: 4).

[00168] Конкретные примеры направляющих фрагментов для конъюгирования с суперантигенами включают, например, любую молекулу, которая способна связываться с клеточной молекулой, и предпочтительно молекулу, специфичную для заболевания, такую как молекула, специфичная для раковых клеток. Направляющий фрагмент может быть выбрана из антител, включая антигенсвязывающие фрагменты, растворимых Т-клеточных рецепторов, факторов роста, интерлейкинов, гормонов и т.д. Примеры антител, направленных против рака, могут включать, без ограничения перечисленными, антитела против CD19, против CD20, антитела против 5T4, антитела против Ep-CAM, антитела против Her-2/неу, антитела против EGFR, антитела против РЭА, антитела против простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) и антитела против IGF-1R. В одном варианте осуществления суперантиген может быть конъюгирован с

иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см. WO8907947) или C242Fab (см. WO9301303).

[00169] Примеры таких опухоленаправленных суперантигенов включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7). В предпочтительном варианте осуществления конъюгатом суперантигена является 5T4 Fab-SEA/E-120, известный в уровне техники как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], который включает две полипептидных последовательности, которые вместе определяют Fab-фрагмент антитела против 5T4, где одна из полипептидных последовательностей дополнительно включает суперантиген SEA/E-120, а именно SEQ ID NO: 8 (химерная V_H цепь Fab 5T4, соединенного трехаминоокислотным линкерами с SEA/E-120) и SEQ ID NO: 9 (химерная V_L цепь Fab 5T4).

[00170] В предпочтительном варианте осуществления композиции изобретения включают опухоленаправленный суперантиген 5T4Fab-SEA/E-120, известный в уровне техники как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], необязательно в комбинации с ингибитором на основе PD-1, таким как антитело против PD-1, например, ниволумаб (Опдиво[®], Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Китруда[®], Мерк), цемиплимаб (Либтайо[®], Regeneron/Sanofi), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), пидилизумаб (CT-011), достарлимаб, синтилимаб, торипалимаб, камрелизумаб, тислелизумаб и пролголимаб, или антитело против PD-L1, такое как авелумаб (БАВЕНСИО[®], EMD Serono/Pfizer), атезолизумаб (ТЕЦЕНТРИК[®], Genentech), и дурвалумаб (ИМФИНЗИ[®], Medimmune/AstraZeneca).

[00171] Составы или лекарственная форма, содержащие конъюгат суперантигена и необязательный иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1, могут включать различные типы носителей в зависимости от того, нужно ли их вводить в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и должны ли они быть стерильными для таких путей введения, как инъекция.

[00172] Примеры носителей или разбавителей включают жиры, масла, воду, растворы хлорида натрия, липиды, липосомы, смолы, связующие, наполнители и т.п. или их комбинации. Композиция также может включать различные антиоксиданты для замедления окисления одного или более компонентов. Кроме того, предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто при использовании консервантов, таких как различные антибактериальные и противогрибковые средства, включающие, помимо прочего, парабены (например, метилпарабены, пропилпарабены), хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал или их комбинации.

[00173] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут включать, например, по меньшей мере приблизительно 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может составлять от приблизительно 2% до приблизительно 75% от веса единицы или от приблизительно 25% до приблизительно 60%, например, и любой диапазон, получаемый в границах указанных значений. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический полупериод

существования, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы будут учтены специалистом в области изготовления таких фармацевтических составов, и, таким образом, различные лекарственные формы и схемы лечения могут быть желательными. Такие определения известны и используются специалистами в данной области.

[00174] Действующие вещества вводят в количестве или количествах, эффективных для уменьшения, снижения, ингибирования или иного прекращения роста или пролиферации раковых клеток, индукции апоптоза, ингибирования ангиогенеза рака или опухоли, ингибирования метастазирования или индукции цитотоксического действия в клетках. Эффективное количество активного(ых) соединения(й), применяемого(ых) для практического осуществления настоящего изобретения, для терапевтического лечения рака изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. Данные термины включают синергические ситуации, такие как представленные и описанные в настоящем изобретении, когда одно средство, такое как конъюгат суперантигена или иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1, может действовать слабо или не действовать вообще, но в комбинации друг с другом, например, без ограничения этим, посредством последовательной введения доз, два или более средств действуют так, что они производят синергический результат.

[00175] В некоторых неограничивающих примерах доза конъюгата суперантигена также может составлять от приблизительно 1 микрограмма/кг/массы тела, приблизительно 5 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 10 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 15 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 50 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 100 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 200 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 350 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 500 микрограммов/кг/массы тела, приблизительно 1 миллиграмма/кг/массы тела, приблизительно 5 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 10 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 50 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 100 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 200 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 350 миллиграммов/кг/массы тела, приблизительно 500 миллиграммов/кг/массы тела до приблизительно 1000 мг/кг/массы тела или больше на введение, включая любой диапазон, получаемый в границах указанных значений. В неограничивающих примерах диапазона, получаемого из числовых значений, перечисленных в настоящем документе, диапазон составляет от приблизительно 5 мг/кг/массы тела до приблизительно 100 мг/кг/массы тела, от приблизительно 5 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 500 миллиграммов/кг/массы телам, от приблизительно 1 микрограмма/кг/массы тела до приблизительно 100 миллиграммов/кг/массы телам. Другие примерные диапазоны дозы, которые изменяются в пределах от приблизительно 1 микрограмма/кг/массы тела до приблизительно 1000 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 1

[illegible]

микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 30 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 15 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 1000 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 100 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 75 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 50 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 40 микрограммов/кг/массы тела, от приблизительно 20 микрограммов/кг/массы тела до приблизительно 30 микрограммов/кг/массы тела и т.д., могут вводить на основе числовых значений, описанных выше.

[00176] В некоторых вариантах осуществления, например, но без ограничения, введения конъюгата суперантигена эффективное количество или доза конъюгата суперантигена, которую вводят, является количеством в пределах 0,01-500 мкг/кг массы тела субъекта, например, 0,1-500 мкг/кг массы тела субъекта и, например, 1-100 мкг/кг массы тела субъекта.

[00177] Предполагается, что эффективное количество или доза иммунопотенциатора, например ингибитора на основе PD-1, который вводят в комбинации с конъюгатом суперантигена, представляет собой дозу, которая приводит по меньшей мере к аддитивному, но предпочтительно синергическому противоопухолевому эффекту, и не препятствует и не ингибирует усиление иммунной системы или активацию Т-клеток. Если иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, вводят одновременно с конъюгатом суперантигена, то иммунопотенциатор можно вводить в низкой дозе, чтобы он не влиял на механизм действия конъюгата суперантигена.

[00178] Как правило, терапевтически эффективное количество ингибитора на основе PD-1, например антитела против PD-1, находится в пределах от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг. Например, пембролизумаб (КИТРУДА[®]) могут вводить периодически в количестве 2 мг/кг путем внутривенной инфузии. Вводимое количество ингибитора на основе PD-1 будет зависеть от таких переменных, как тип и степень заболевания или показания, подлежащего лечению, общее состояние здоровья пациента, активность *in vivo* конъюгата суперантигена и ингибитора на основе PD-1, фармацевтический состав и путь введения.

V. Схемы лечения и показания

[00179] Схемы лечения также могут изменяться и часто зависят от типа опухоли, локализации опухоли, прогрессирования заболевания, состояния здоровья и возраста пациента. Некоторые типы опухолей могут потребовать более агрессивных протоколов лечения, но в то же время пациенты могут быть неспособны переносить более агрессивные схемы лечения. Медработник часто лучше всего может подходить для принятия таких решений на основе своих навыков в данной области, а также сведений по

эффективности и токсичности (если таковые имеются) терапевтических составов.

[00180] В конкретном варианте осуществления изобретения способы лечения согласно изобретению включают введение опухоленаправленного суперантигена, необязательно в комбинации с иммунопотенциатором, например ингибитором на основе PD-1, пациенту, нуждающемуся в этом, т.е. онкопациенту. Такие комбинированные способы лечения включают, например, введение любого опухоленаправленного суперантигена и/или иммунопотенциатора, например ингибитора на основе PD-1, как описано в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления изобретения опухоленаправленный суперантиген включает бактериальный суперантиген, включающий, без ограничения перечисленными, стафилококковый энтеротоксин (SE), экзотоксин *Streptococcus pyogenes* (SPE), токсин синдрома токсического шока *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE), конъюгированные с направляющим фрагментом.

[00181] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена включает последовательность суперантигена дикого типа или рекомбинантного суперантигена, такую как последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2), любая из которых может быть модифицирована таким образом, что аминокислоты в любой из идентифицированных областей А-Е (см. **ФИГУРУ 2**) заменяют другими аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления суперантигеном, включенным в конъюгат, является SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3) или SEA_{D227A} (SEQ ID NO: 4).

[00182] Конкретные примеры направляющих фрагментов, конъюгируемых с суперантигенами, включают, например, любую молекулу, которая способна связываться с клеточной молекулой, и предпочтительно молекулу, специфическую для заболевания, такую как молекула, специфическая для раковых клеток. Направляющий фрагмент может быть выбран из антител, включая антигенсвязывающие фрагменты, растворимых Т-клеточных рецепторов, факторов роста, интерлейкинов, гормонов и т.д. Примеры направляющих антител против рака могут включать, без ограничения перечисленными, антитела против CD19, против CD20, антитела против 5T4, антитела против Ер-CAM, антитела против Her-2/neu, антитела против EGFR, антитела против РЭА, антитела против простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) и антитела против IGF-1R. В одном варианте осуществления суперантиген может быть конъюгирован с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см. WO8907947) или C242Fab (см. WO9301303).

[00183] Примеры таких опухоленаправленных суперантигенов включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7). В предпочтительном варианте осуществления конъюгатом суперантигена является 5T4 Fab-SEA/E-120, известный в уровне техники как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®],

который включает две полипептидных последовательности, которые вместе определяют Fab-фрагмент антитела против 5T4, где одна из полипептидных последовательностей дополнительно включает суперантиген SEA/E-120, а именно SEQ ID NO: 8 (химерная V_H цепь 5T4 Fab, соединенная линкером из трех аминокислот с SEA/E-120) и SEQ ID NO: 9 (химерная V_L цепь 5T4 Fab).

[00184] В предпочтительном варианте осуществления композиции согласно изобретению включают опухоленаправленный суперантиген 5T4Fab-SEA/E-120, известный в уровне техники как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], необязательно в комбинации с ингибитором на основе PD-1, таким как антитело против PD-1, например, ниволумаб (Опдиво[®], Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Китруда[®], Мерк), цемиплимаб (Либтайо[®], Regeneron/Sanofi), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), пидилизумаб (CT-011), достарлимаб, синтилимаб, торипалимаб, камрелизумаб, тислелизумаб и пролголимаб, или антитело против PD-L1, такое как авелумаб (Бавенцио[®], EMD Serono/Pfizer), атезолизумаб (Тецентрик[®], Genentech) и дурвалумаб (Имфинзи[®], Medimmune/AstraZeneca).

[00185] Кроме того, конъюгат суперантигена и/или иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, можно вводить совместно или последовательно с одним или больше дополнительными средствами, которые усиливают активность и/или селективность терапевтического эффекта. Такие средства включают, например, кортикостероиды, дополнительные иммуномодуляторы и такие соединения, которые предназначены для снижения возможной иммунореактивности пациента по отношению к вводимому конъюгату суперантигена. Например, иммунореактивность по отношению к вводимому суперантигену может быть снижена путем совместного введения, например, с антителом против CD20 и/или антителом против CD19, что снижает выработку антител против суперантигена у субъекта.

[00186] Предпочтительно, пациенты, подлежащие лечению, будут иметь нормальную функцию костного мозга (определенную как абсолютное количество гранулоцитов в периферической крови $>2000/\text{мм}^3$ и количество тромбоцитов $100000/\text{мм}^3$), нормальную функцию печени (билирубин $<1,5 \text{ мг/дл}$) и нормальную функцию почек (креатинин $<1,5 \text{ мг/дл}$).

[00187] В некоторых вариантах осуществления схема лечения согласно настоящему изобретению может включать одновременный контакт неоплазии или опухолевых клеток с конъюгатом суперантигена и иммунопотенциатором, например ингибитором на основе PD-1. Это может быть достигнуто путем контакта клетки с одной композицией или фармакологическим составом, который включает оба средства, или путем контакта клетки с двумя разными композициями или составами в одно и то же время, где одна композиция включает конъюгат суперантигена, а другая включает иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1.

[00188] Также конъюгат суперантигена может предшествовать или следовать после иммунопотенциатора, например ингибитора на основе PD-1, с интервалами в пределах от

минут, дней до недель. В вариантах осуществления, где иммунопотенциатор и конъюгат суперантигена применяют к клетке по отдельности, нужно гарантировать, что между временем каждой доставки не пройдет значительный период времени, чтобы конъюгат суперантигена и иммунопотенциатор все еще были бы способны оказывать с преимуществом комбинированное воздействие на клетку. В таких случаях предполагается, что клетку можно подвергать контакту с обоими средствами в течение приблизительно 12-72 часов друг после друга. Впрочем, в некоторых ситуациях может быть желательным значительно увеличить период времени для лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[00189] Могут использоваться различные комбинации, в которых конъюгат суперантигена обозначен "А", а иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, обозначен "В": А/В/А, В/А/В, В/В/А, А/А/В, А/В/В, В/А/А, А/В/В/В, В/А/В/В, В/В/В/А, В/В/А/В, А/А/В/В, А/В/А/В, А/В/В/А, В/В/А/А, В/А/В/А, В/А/А/В, А/А/А/В, В/А/А/А, А/В/А/А и А/А/В/А.

[00190] Также предполагается, что настоящее изобретение может применяться в комбинации с хирургическим вмешательством. В случае хирургического вмешательства настоящее изобретение может применяться до хирургического вмешательства, например, чтобы неоперабельную опухоль можно было подвергнуть резекции. В альтернативе, настоящее изобретение может применяться во время хирургического вмешательства и/или после него, для лечения остаточного или метастатического заболевания. Например, в ложе резецированной опухоли можно производить инъекцию или перфузию составом, включающим опухоленаправленный суперантиген и/или иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1. Перфузию могут продолжать после резекции, например, оставляя катетер, имплантированный на участке хирургического вмешательства. Также предусмотрено периодическое послеоперационное лечение. Любая комбинация терапии согласно изобретению с хирургическим вмешательством включена в объем изобретения.

[00191] В соответствующих случаях также может применяться непрерывное введение, например, когда опухоль иссекают, а ложе опухоли обрабатывают для устранения остаточного микроскопического заболевания. Предпочтительна доставка с помощью шприца или каутеризации. Такая непрерывная перфузия может проходить в течение от приблизительно 1-2 часов до приблизительно 2-6 часов, до приблизительно 6-12 часов, до приблизительно 12-24 часов, до приблизительно 1-2 дней, до приблизительно 1-2 недель или дольше после начала лечения. Как правило, доза терапевтической композиции при непрерывной перфузии будет эквивалентна дозе, вводимой при однократной или многократной инъекции, скорректированной на период времени, в течение которого проводят перфузию. Также предполагается, что для введения терапевтических композиций согласно настоящему изобретению может использоваться перфузия конечностей, в особенности при лечении меланом и сарком.

[00192] Типичный курс лечения в случае первичной опухоли или после иссечения

ложа опухоли, может включать многократные дозы. Типичное лечение первичной опухоли может включать введение 6 доз в течение двухнедельного периода. Двухнедельную схему могут повторять один, два, три, четыре, пять, шесть или более раз. Во время курса лечения могут производить повторную оценку необходимости завершения введения запланированных доз.

[00193] Иммунотерапия конъюгатом суперантигена часто приводит к быстрой (в течение нескольких часов) и мощной поликлональной активации Т-лимфоцитов. Курс лечения конъюгатом суперантигена может включать от 4 до 5 ежедневных внутривенных инъекций лекарственного препарата конъюгата суперантигена. Такие курсы лечения могут проводить, например, с интервалами от 4 до 6 недель. Воспаление с инфильтрацией СТЛ в опухоль является одним из основных эффекторов противоопухолевых терапевтических суперантигенов. После короткого периода массивной активации и дифференцировки СТЛ-лимфоцитов ответ Т-клеток быстро (в течение 4-5 дней) снижается до исходного уровня. Таким образом, период пролиферации лимфоцитов, в течение которого цитостатические средства могут препятствовать лечению суперантигеном, короткий и четко определенный. Только с терапией суперантигеном/иммунопотенциатором согласно настоящему изобретению возможны такие четкие временные границы активности, что обеспечивает возможность нового интегрированного лечения с применением цитостатического средства/иммунотерапии в высоких дозах.

[00194] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгат суперантигена, например, суперантиген, конъюгированный предусмотренный в настоящем документе, ежедневно в течение 2-6 дней подряд (например, 2, 3, 4, 5 или 6 дней подряд), каждые 2-12 недель (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор на основе PD-1, например, антитело против PD-1, например, антитело против PD-1, предусмотренное в настоящем документе, каждые 1-5 недель (например, каждую 1, 2, 3, 4 или 5 недель). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят: (i) конъюгат суперантигена ежедневно в течение 2-6 дней подряд (например, 2, 3, 4, 5 или 6 дней подряд), каждые 2-12 недель (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель) и (ii) ингибитор на основе PD-1 каждые 1-5 недель (например, каждую 1, 2, 3, 4 или 5 недель). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят: (i) конъюгат суперантигена ежедневно в течение 4 дней подряд каждые 3-4 недели (например, 3 или 4 недели) и (ii) ингибитор на основе PD-1 каждые 2-4 недели (например, каждые 2, 3 или 4 недели).

[00195] Предполагается, что ряд онкологических заболеваний можно лечить с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе, включая, без ограничения перечисленными, первичную или метастатическую меланому, аденокарциному, плоскоклеточный рак, аденосквамозную карциному, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак

поджелудочной железы, рак толстой кишки, множественную миелому, нейробластому, НФЦ, рак мочевого пузыря, рак шейки матки и т.п.

[00196] Более того, рак, который можно лечить с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе, может быть основан на локализации в организме и/или системе, подлежащей лечению, такой как, без ограничения, костная ткань (например, семейство опухолей Юинга, остеосаркома); головной мозг (например, опухоль головного мозга у взрослых (например, опухоль головного мозга у взрослых, глиома ствола головного мозга (у детей), астроцитомы мозжечка (у детей), церебральная астроцитомы/злокачественная глиома (у детей), эпендимомы (у детей), медуллобластома (у детей), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома (у детей), глиома зрительного пути и гипоталамуса (у детей) и опухоль головного мозга у детей (другое)); молочная железа (например, рак молочной железы у женщин или мужчин); пищеварительная система/желудочно-кишечный тракт (например, рак анального канала, рак желчных протоков (внепеченочный), карциноидная опухоль (желудочно-кишечный тракт), рак толстой кишки, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак печени (первичный у взрослых), рак печени (у детей), рак поджелудочной железы, рак тонкой кишки, рак желудка); эндокринные (например, аденокарцинома, карциноидная опухоль (желудочно-кишечный тракт), карцинома из островковых клеток (эндокринная часть поджелудочной железы), рак паращитовидной железы, феохромоцитомы, опухоль гипофиза, рак щитовидной железы); глаза (например, меланома (внутриглазная), ретинобластома); мочеполовая система (например, рак мочевого пузыря, рак почки (почечноклеточный), рак полового члена, рак предстательной железы, рак почечной лоханки и мочеточника (переходно-клеточный), рак яичка, рак уретры, опухоль Вильмса и другие опухоли почек у детей); зародышевые клетки (например, экстракраниальная опухоль из зародышевых клеток (у детей), внегонадная опухоль из зародышевых клеток, опухоль яичника из зародышевых клеток, рак яичка); гинекологические (например, рак шейки матки, рак эндометрия, гестационная трофобластическая опухоль, эпителиальный рак яичника, герминогенная опухоль яичника, опухоль яичника с низким потенциалом злокачественности, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы); голова и шея (например, гипоглоточный рак, рак гортани, рак губы и ротовой полости, метастатический плоскоклеточный рак шеи без выявленного первичного очага, рак носоглотки, рак ротоглотки, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак слюнных желез); легкое (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого); лимфома (например, лимфома, связанная со СПИДом, кожная Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина (у взрослых), лимфома Ходжкина (у детей), лимфома Ходжкина во время беременности, грибовидный микоз, неходжкинская лимфома (у взрослых), неходжкинская лимфома (у детей), неходжкинская лимфома во время беременности, первичная лимфома центральной нервной системы, синдром Сезари, Т-клеточная лимфома (кожная), макроглобулинемия Вальденстрема); опорно-двигательный аппарат (например, семейство опухолей Юинга,

остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, рабдомиосаркома (у детей), саркома мягких тканей (у взрослых), саркома мягких тканей (у детей), саркома матки); неврологические (например, опухоль головного мозга у взрослых, опухоль головного мозга у детей (например, глиома ствола головного мозга, астроцитома мозжечка, церебральная астроцитома/злокачественная глиома, эпендимома, медуллобластома, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома, глиома глазного пути и гипоталамуса, другие опухоли головного мозга) нейробластома, опухоль гипофиза, первичная лимфома центральной нервной системы); респираторные/грудные (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома, тимома и карцинома тимуса); и кожа (например, Т-клеточная лимфома кожи, саркома Капоши, меланома и рак кожи).

[00197] Следует понимать, что способ может применяться для лечения различных форм рака, например рака, выбранного из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи.

[00198] Кроме того, рак может включать опухоль, состоящую из опухолевых клеток. Например, опухолевые клетки могут включать, без ограничения перечисленными, клетку меланомы, клетку рака мочевого пузыря, клетку рака молочной железы, клетку рака легкого, клетку рака толстой кишки, клетку рака предстательной железы, клетку рака печени, клетку рака поджелудочной железы, клетку рака желудка, клетку рака яичка, клетку рака почки, клетку рака яичника, клетку рака лимфатической системы, клетку рака кожи, клетку рака головного мозга, клетку рака кости или клетку рака мягких тканей. Примеры солидных опухолей, которые можно лечить в соответствии с изобретением, включают саркомы и карциномы, такие как, без ограничения перечисленными: фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папулярные аденокарциномы, цистаденокарцинома медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцистома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

VI. Наборы

[00199] Кроме того, в изобретении предложены наборы, включающие, например, первый контейнер, содержащий конъюгат суперантигена, и второй контейнер, содержащий иммунопотенциатор, например, ингибитор на основе PD-1, такой как антитело против PD-1. Такой набор также может содержать дополнительные средства, такие как, например, кортикостероид или другой липидный модулятор. Контейнерные средства сами могут быть шприцем, пипеткой и/или другим таким подобным устройством, из которого состав можно наносить на определенную область тела, вводить животному, и/или применять и/или смешивать с другими компонентами набора.

[00200] Наборы могут включать подходящим образом разделенные на аликвоты конъюгат суперантигена и/или иммунопотенциатор, например ингибитор на основе PD-1, и, необязательно, композиции липидов и/или дополнительных средств согласно настоящему изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Когда компоненты набора представлены в виде одного и/или больше жидких растворов, жидкий раствор является стерильным водным раствором.

[00201] Практическая реализация изобретения будет более понятна из приведенных выше примеров, которые представлены в настоящем документе исключительно в иллюстративных целях, и их не следует рассматривать в качестве какого-либо ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Терапия опухоленаправленным суперантигеном и/или мышинным антителом-ингибитором против PD-1 в модели рака толстой кишки MC38 на мышах

[00202] В данном примере описано исследование, в котором тестировали действие опухоленаправленного суперантигена, C215Fab-SEA, и/или мышинового антитела против PD-1 против опухоли толстой кишки MC38-EpCAM в модели на мышах *in vivo*. Терапию суперантигеном и/или мАт против PD-1 исследовали в модели сингенной опухоли с использованием клеток рака толстой кишки MC38, трансфицированных антигеном карциномы толстой кишки EpCAM человека, который распознается антителом C215.

[00203] Опухоленаправленный суперантиген C215Fab-SEA представляет собой слитый белок, который включает опухолереактивное мАт (C215Fab) и бактериальный суперантиген стафилококковый энтеротоксин А (SEA). C215Fab-SEA использовали в качестве модельного опухоленаправленного суперантигена вместо, например, наптумомаба эстафенатокса/ANYARA[®], чтобы облегчить эксперименты на мышах *in vivo*. Кроме того, антитело против мышинового PD-1 (RMP1-14, BIOXCELL) использовали в качестве модельного антитела против PD-1 для облегчения экспериментов на мышах *in vivo*.

[00204] Для исследования мышам C57BL/6 подкожно вводили в бок 5×10^5 клеток MC38-EpCAM. Опухоли измеряли каждые 2-3 дня (длина×ширина) штангенциркулем. Когда объем опухоли достигал 30-60 мм³ (день 5), 10 мышей в каждой группе лечения

получали следующее лечение: (i) ежедневные в/в инъекции C215Fab-SEA (20 мкг/мышь) в дни 5-8, 12-15 и 19-22; и/или (ii) в/б инъекции мАт против PD-1 (50 мкг/мышь) два раза в неделю с 8 по 25 день. Контрольная группа получала PBS таким же способом введения и согласно такой же схеме, что и в группе комбинированной терапии. Мышей умерщвляли, когда опухоль достигала 2,25 см³ или после образования язв. Во время исследования животных взвешивали по меньшей мере два раза в неделю и часто наблюдали на предмет состояния здоровья и явных признаков каких-либо нежелательных побочных эффектов, связанных с лечением (TR).

[00205] Рост опухоли показан на **ФИГУРАХ 4А-4Д** и **ФИГУРЕ 5**. Более медленный рост опухоли наблюдали при монотерапии с применением либо мАт против PD-1, либо C215Fab-SEA (TTS), по сравнению с контролем. Однако комбинация C215Fab-SEA с мАт против PD-1 оказала наиболее значимое влияние на объем опухоли (TGI 67%). В группе C215Fab-SEA у 1 из 10 мышей наблюдали полную регрессию опухоли (**ФИГУРА 4С**). В отличие от этого, лечение C215Fab-SEA и мАт против PD-1 приводило к полному отторжению опухоли у 4 из 10 мышей (**ФИГУРА 4Д**).

[00206] Выживаемость показана на **ФИГУРЕ 6**. При лечении мАт против PD-1 не наблюдали повышения выживаемости по сравнению с контролем. Общая выживаемость при лечении C215Fab-SEA была значительно более длительной по сравнению с контролем. Наиболее сильный эффект наблюдали при комбинированной терапии со значительно более длительной выживаемостью по сравнению с каждой монотерапией. Комбинированное лечение хорошо переносилось, при этом никаких признаков нежелательных явлений и/или потери массы тела не регистрировали (**ФИГУРА 7**).

[00207] Эти результаты демонстрируют потенциал опухоленаправленного суперантигена (например, C215Fab-SEA или наптумомаба эстафенатокса/ANYARA[®]), необязательно в комбинации с иммунопотенциатором (например, ингибитором на основе PD-1, например, антителом против PD-1) для лечения рака, например, рака толстой кишки. Терапия приводит к мощной индукции противоопухолевого иммунитета и даже полного ответа, т.е. отторжения опухоли, у некоторых субъектов.

Пример 2: Иммунная память после терапии опухоленаправленным суперантигеном и/или ингибитором против PD-1 мыши в модели рака толстой кишки MC38 на мышях

[00208] В данном примере описано исследование, в котором тестировали долговременный эффект лечения в модели опухоли толстой кишки MC38-EpCAM *in vivo* с применением опухоленаправленного суперантигена, C215Fab-SEA, и/или мышинового антитела против PD-1. В частности, у вылеченных мышей из Примера 1 исследовали иммунную память путем повторного введения опухоли.

[00209] Через 50 дней после последнего лечения C215Fab-SEA и/или мАт против PD-1, описанного в Примере 1, всех выживших вылеченных мышей (животные с полным ответом, включая 4 мышей из группы комбинированного лечения и 1 мышь из группы лечения C215FAB-SEA) повторно заражали путем п/к инъекций 500 тыс. опухолевых

клеток MC38-EpCAM в правый бок и 500 тыс. исходных опухолевых клеток MC38 в левый бок. По 5 intactных мышей использовали в качестве контроля.

[00210] Объем опухоли показан на **ФИГУРАХ 8 и 9**. У 100% intactных мышей опухоли развивались на боках с обеих сторон. При этом у всех мышей после предыдущего лечения опухоли полностью отторгались при втором заражении (с обеих сторон). В частности, у мышей после предыдущего лечения исходные опухолевые клетки MC38 отторгались, даже несмотря на то, что они не экспрессировали раковый антиген EpCAM, против которого было направлено предыдущее лечение C215Fab-SEA.

[00211] Начальные результаты по выживаемости (до 203 дней после повторного заражения) показаны на **ФИГУРЕ 10А** и полные результаты по выживаемости показаны на **ФИГУРЕ 10В**. Все intactные мыши погибали на день 35 исследования. Мышь, ранее получавшая только C215Fab-SEA, погибла в день 365 исследования от возрастных причин. Две из мышей, ранее получавших C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1, погибли в дни 494 и 525 исследования от возрастных причин (подтверждено при вскрытии). Остальные две мыши, ранее получавшие C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1, были умерщвлены в день 584 исследования для дополнительных оценок.

[00212] В совокупности эти результаты демонстрируют, что мыши обладают долговременной иммунологической памятью против опухолевых клеток MC38-EpCAM и исходных опухолевых клеток MC38. Эти результаты дают основания предполагать, что терапия, включающая опухоленаправленный суперантиген (например, C215Fab-SEA или наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®]), необязательно вместе с иммунопотенциатором (например, ингибитором на основе PD-1, например, антителом против PD-1), усиливает распространение эпитопов опухоли. В частности, эти результаты указывают, что опухоленаправленный суперантиген (например, C215Fab-SEA или наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®]) повышает распознавание антигена-мишени (например, EpCAM или 5T4) Т-клетками и, кроме того, повышает распознавание других антигенов Т-клетками, вызывая в результате долговременный ответ памяти против опухоли.

Пример 3: Иммунная память после терапии опухоленаправленным суперантигеном и/или ингибитором против PD-1 мыши в модели рака толстой кишки MC38 на мышах

[00213] В данном примере описаны исследования *in vitro*, в которых тестировали долговременный противоопухолевый ответ памяти Т-клеток у мышей, получавших опухоленаправленный суперантиген и антитело против PD-1.

[00214] В 584 день эксперимента с повторным заражением, описанного в Примере 2, умерщвляли двух выживших мышей, ранее получавших C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1. У умерщвленных мышей выделяли Т-клетки. Т-клетки, полученные от intactных мышей и мышей с опухолью MC38-EpCAM (TV=100 мм³; без лечения), использовали в качестве контроля. Т-клетки метили красителем для окрашивания пролиферирующих клеток и культивировали с клетками MC38 или MC38-EpCAM опухоли толстой кишки мыши при соотношении эффектор/мишень 10:1 в течение 5 дней.

[00215] C215Fab-SEA может активировать Т-клетки, экспрессирующие TRBV3. Чтобы определить, опосредована ли какая-либо долговременная противоопухолевая память частично Т-клетками, кроме тех Т-клеток, которые были непосредственно активированы C215Fab-SEA, в этих исследованиях проводили только анализ активности TRBV3-отрицательных CD4 и CD8 Т-клеток.

[00216] Пролиферацию Т-клеток в ответ на опухолевые клетки исследовали при измерении разведения красителя для анализа пролиферации с помощью FACS. Результаты показаны на **ФИГУРАХ 11А-11Н**. TRBV3-отрицательные CD4 и CD8 Т-клетки, выделенные у контрольных мышей, не делились после инкубирования с опухолевыми клетками (**Фигуры 11А, 11В, 11Е и 11F**). При этом TRBV3-отрицательные CD4 и CD8 Т-клетки, выделенные у повторно зараженных вылеченных мышей, значимо пролиферировали после инкубирования как с раковыми клетками MC38-ЕpСAM, так и с MC38 (**Фигуры 11С, 11D, 11G и 11Н**).

[00217] Дифференцировку клеток памяти (с высоким уровнем CD44 и CD62L-положительных) в активированные эффекторные клетки (с высоким уровнем CD44 и CD62L-отрицательных) определяли по экспрессии CD62L и CD44 на Т-клетках. Результаты показаны на **ФИГУРАХ 12А-12Н**. В соответствии с предыдущими результатами, TRBV3-отрицательные CD4 и CD8 Т-клетки, выделенные у контрольных мышей, не показали значимого увеличения уровня эффекторных клеток после инкубирования с опухолевыми клетками (**ФИГУРЫ 12А, 12В, 12Е и 12F**). Однако TRBV3-отрицательные CD4 и CD8 Т-клетки, выделенные у повторно зараженных вылеченных мышей, демонстрировали значимое повышение уровня эффекторных клеток после инкубирования как с раковыми клетками MC38-ЕpСAM, так и с раковыми клетками MC38 (**ФИГУРЫ 12С, 12D, 12G и 12Н**).

[00218] Для оценки способности CD8 Т-клеток становиться цитотоксическими Т-клетками, Т-клетки повторно стимулировали РМА и иономицином и измеряли уровни гранзима В, ФНО α и IFN γ с помощью FACS. Результаты показаны на **ФИГУРАХ 13А-13Н**. Опять же, TRBV3-отрицательные CD8 Т-клетки, выделенные у контрольных мышей, не показали никакого поддающегося обнаружению повышения гранзима В, ФНО α и IFN γ после повторной стимуляции (**ФИГУРЫ 13А, 13В, 13Е и 13F**). Однако TRBV3-отрицательные CD8 Т-клетки, выделенные у повторно зараженных вылеченных мышей, показали значимое повышение экспрессии гранзима В и секреции IFN γ и ФНО α после повторной стимуляции (**ФИГУРЫ 13С, 13D, 13G и 13Н**).

[00219] В заключение следует отметить, что Т-клетки, выделенные у мышей, получавших C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1, распознавали опухолевые клетки *in vitro*, даже если Т-клетки были выделены у мышей через 584 дня после повторного заражения и через 634 дня после последнего лечения. Эти результаты демонстрируют, что мыши, обработанные C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1, обладают долговременной иммунологической памятью против опухолевых клеток MC38. Кроме того, такой ответ долговременной иммунологической памяти не был

ограничен клетками, экспрессирующими антиген, на который направлен C215Fab-SEA (ErCAM), или Т-клетками, непосредственно активированными C215Fab-SEA (Т-клетками, экспрессирующими TRBV3). Таким образом, эти результаты указывают, что ответ долговременной иммунологической памяти после лечения C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1, вызван распространением эпитопа, и что лечение C215Fab-SEA в комбинации с мАт против PD-1 генерировало иммунный ответ на множественные опухолевые антигены.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ОТСЫЛКИ

[00220] Полное описание каждого из патентов и научных документов, указанных в настоящем документе, включено путем отсылки во всех отношениях.

НЕКОТОРЫЕ НЕОГРАНИЧИВАЮЩИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00221] Некоторые неограничивающие иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения указаны ниже в следующих пронумерованных параграфах:

[00222] 1. Способ снижения вероятности рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00223] 2. Способ задержки рецидива рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00224] 3. Способ лечения рака и стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопов у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00225] 4. Способ индукции по меньшей мере первого и второго эпитопспецифичного иммунного ответа у субъекта, имеющего рак, где способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора, где первый эпитопспецифичный иммунный ответ направлен на раковый антиген посредством конъюгата суперантигена, и второй эпитопспецифичный иммунный ответ не направлена на раковый антиген или суперантиген и опосредован распространением эпитопов.

[00226] 5. Способ опосредования длительного (по меньшей мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года или больше)

иммунного ответа против множества различных антигенов рака, экспрессированных раковой клеткой у субъекта, нуждающегося в лечении, где способ включает (или состоит по существу из) введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает один тип ракового антигена, экспрессируемого раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00227] 6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где рак является 5T4-экспрессирующим раком.

[00228] 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где рак выбран из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи.

[00229] 8. Способ варианта осуществления 7, где рак является раком толстой кишки или раком толстой и прямой кишки.

[00230] 9. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, которая не экспрессирует раковый антиген, где способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00231] 10. Способ варианта осуществления 9, где раковая клетка выбрана из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и клетки рака кожи.

[00232] 11. Способ варианта осуществления 10, где раковая клетка является клеткой рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки.

[00233] 12. Способ лечения рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта; и, необязательно, (ii) эффективного количества иммунопотенциатора.

[00234] 13. Способ любого из вариантов осуществления 1-12, где раковый антиген выбран из ЕрСАМ и 5T4.

[00235] 14. Способ варианта осуществления 13, где раковым антигеном является 5T4.

[00236] 15. Способ любого из варианта осуществления 1-14, где иммунопотенциатор является ингибитором на основе PD-1.

[00237] 16. Способ варианта осуществления 15, где ингибитор на основе PD-1 является ингибитором PD-1 или PD-L1.

[00238] 17. Способ любого из варианта осуществления 1-16, где субъект ранее получал различную противоопухолевую терапию.

[00239] 18. Способ варианта осуществления 17, где рак является рефрактерным к противоопухолевой терапии.

[00240] 19. Способ варианта осуществления 18, где рак рецидивировал после противоопухолевой терапии

[00241] 20. Способ любого из вариантов осуществления 17-19, где противоопухолевая терапия включает Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR) или биспецифичный активатор Т-клеток (BiTE).

[00242] 21. Способ любого из вариантов осуществления 1-20, где конъюгат суперантигена вводят субъекту до, одновременно или после ингибитора PD-1 или PD-L1.

[00243] 22. Способ любого из вариантов осуществления 1-21, где суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологический вариант и/или фрагмент.

[00244] 23. Способ любого из вариантов осуществления 1-22, где суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

[00245] 24. Способ любого из вариантов осуществления 1-23, где направляющий фрагмент является антителом.

[00246] 25. Способ варианта осуществления 24, где антитело является антителом против 5T4.

[00247] 26. Способ варианта осуществления 25, где антитело против 5T4 включает Fab-фрагмент, связывающий раковый антиген 5T4.

[00248] 27. Способ варианта осуществления 26, где антитело против 5T4 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-222 из SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 из SEQ ID NO:9.

[00249] 28. Способ любого из вариантов осуществления 1-27, где конъюгат суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO:9.

[00250] 29. Способ любого из вариантов осуществления 16-28, где ингибитор PD-1 является антителом против PD-1.

[00251] 30. Способ варианта осуществления 29, где антитело против PD-1 выбрано из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба.

[00252] 31. Способ любого из варианта осуществления 16-30, где ингибитор PD-L1 является антителом против PD-L1.

[00253] 32. Способ варианта осуществления 31, где антитело против PD-L1

выбрано из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

[00254] 33. Суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками, у субъекта для: (i) уменьшения вероятности рецидива рака у субъекта, (ii) задержки повторного возникновения рака у субъекта или (iii) стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у субъекта.

[00255] 34. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками, у субъекта для индукции по меньшей мере первого и второго эпитопспецифичного иммунного ответа у субъекта, имеющего рак, где первый эпитопспецифичный иммунный ответ направлен на раковый антиген посредством конъюгата суперантигена, а второй эпитопспецифичный иммунный ответ не направлен на раковый антиген или суперантиген и опосредован распространением эпитопа.

[00256] 35. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает один тип ракового антигена, экспрессируемого раковыми клетками у субъекта, для опосредования длительного (по меньшей мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года или больше) иммунного ответа против множества различных раковых антигенов, экспрессируемых раковой клеткой, у субъекта, нуждающегося в лечении.

[00257] 36. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-35 для применения в комбинации с иммунопотенциатором.

[00258] 37. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-36, где рак является 5T4-экспрессирующим раком.

[00259] 38. Суперантиген любого из пунктов 33-37, где рак выбран из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи.

[00260] 39. Суперантиген варианта осуществления 39, где рак является раком толстой кишки или раком толстой и прямой кишки.

[00261] 40. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, для стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, не экспрессирующей раковый антиген.

[00262] 41. Суперантиген варианта осуществления 40, для применения в комбинации с иммунопотенциатором.

[00263] 42. Суперантиген варианта осуществления 41, где раковая клетка выбрана из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака

печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и клетки рака кожи.

[00264] 43. Суперантиген варианта осуществления 42, где раковая клетка является клеткой рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки.

[00265] 44. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-43, где раковый антиген выбран из ЕpСАМ и 5Т4.

[00266] 45. Суперантиген варианта осуществления 44, где раковым антигеном является 5Т4.

[00267] 46. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-45, где иммунопотенциатор является ингибитором на основе PD-1.

[00268] 47. Суперантиген варианта осуществления 46, где ингибитор на основе PD-1 является ингибитором PD-1 или PD-L1.

[00269] 48. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-47, где субъект ранее получал другую противоопухолевую терапию.

[00270] 49. Суперантиген варианта осуществления 48, где рак является рефрактерным к противоопухолевой терапии.

[00271] 50. Суперантиген варианта осуществления 49, где рак рецидивировал после противоопухолевой терапии

[00272] 51. Суперантиген любого из вариантов осуществления 48-50, где противоопухолевая терапия включает Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR) или биспецифичный активатор Т-клеток (BiTE).

[00273] 52. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-51, где конъюгат суперантигена вводят субъекту до, одновременно или после ингибитора PD-1 или PD-L1.

[00274] 53. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-52, где суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологический вариант и/или фрагмент.

[00275] 54. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-53, где суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

[00276] 55. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-54, где направляющий фрагмент является антителом.

[00277] 56. Суперантиген варианта осуществления 55, где антитело является антителом против 5Т4.

[00278] 57. Способ варианта осуществления 56, где антитело против 5Т4 включает Fab-фрагмент, связывающий раковый антиген 5Т4.

[00279] 58. Суперантиген варианта осуществления 57, где антитело против 5Т4 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-222 из SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 из SEQ ID NO:9.

[00280] 59. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-58, где конъюгат

суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO:9.

[00281] 60. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-59, где ингибитор PD-1 является антителом против PD-1.

[00282] 61. Суперантиген варианта осуществления 60, где антитело против PD-1 выбрано из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба.

[00283] 62. Суперантиген любого из вариантов осуществления 33-61, где ингибитор PD-L1 является антителом против PD-L1.

[00284] 63. Суперантиген варианта осуществления 62, где антитело против PD-L1 выбрано из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

[00285] 64. Фармацевтическая композиция для применения по любому из терапевтических показаний, определенных способами вариантов осуществления 1-32, включая суперантиген любого из вариантов осуществления 33-63.

[00286] 65. Фармацевтическая композиция варианта осуществления 64, показанная для применения в комбинации с иммуностимулятором.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00287] Изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отступления от своей сущности или существенных характеристик. Таким образом, представленные выше варианты осуществления следует считать во всех отношениях иллюстративными, а не ограничивающими изобретение, описанное в настоящем документе. Таким образом, объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками у субъекта, для: (i) уменьшения вероятности рецидива рака у субъекта, (ii) задержки повторного возникновения рака у субъекта или (iii) стимуляции противоопухолевой иммунной памяти и/или распространения эпитопа у субъекта.

2. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками, у субъекта для индукции по меньшей мере первого и второго эпитопспецифичного иммунного ответа у субъекта, имеющего рак, где первый эпитопспецифичный иммунный ответ направлен на раковый антиген посредством конъюгата суперантигена, а второй эпитопспецифичный иммунный ответ не направлен на раковый антиген или суперантиген и опосредован распространением эпитопа.

3. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает один тип ракового антигена, экспрессируемого раковыми клетками, у субъекта для опосредования длительного (по меньшей мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года или больше) иммунного ответа против множества различных раковых антигенов, экспрессируемых раковой клеткой, у субъекта, нуждающегося в лечении.

4. Суперантиген по любому из пп.1-3 для применения в комбинации с иммунопотенциатором.

5. Суперантиген по любому из пп.1-4, где рак является 5T4-экспрессирующим раком.

6. Суперантиген по любому из пп.1-5, где рак выбран из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи.

7. Суперантиген по п.6, где рак является раком толстой кишки или раком толстой и прямой кишки.

8. Конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывает раковый антиген, для стимуляции иммунного ответа у субъекта против раковой клетки, не экспрессирующей раковый антиген.

9. Суперантиген по п.8, для применения в комбинации с иммунопотенциатором.

10. Суперантиген по п.9, где раковая клетка выбрана из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и клетки рака кожи.

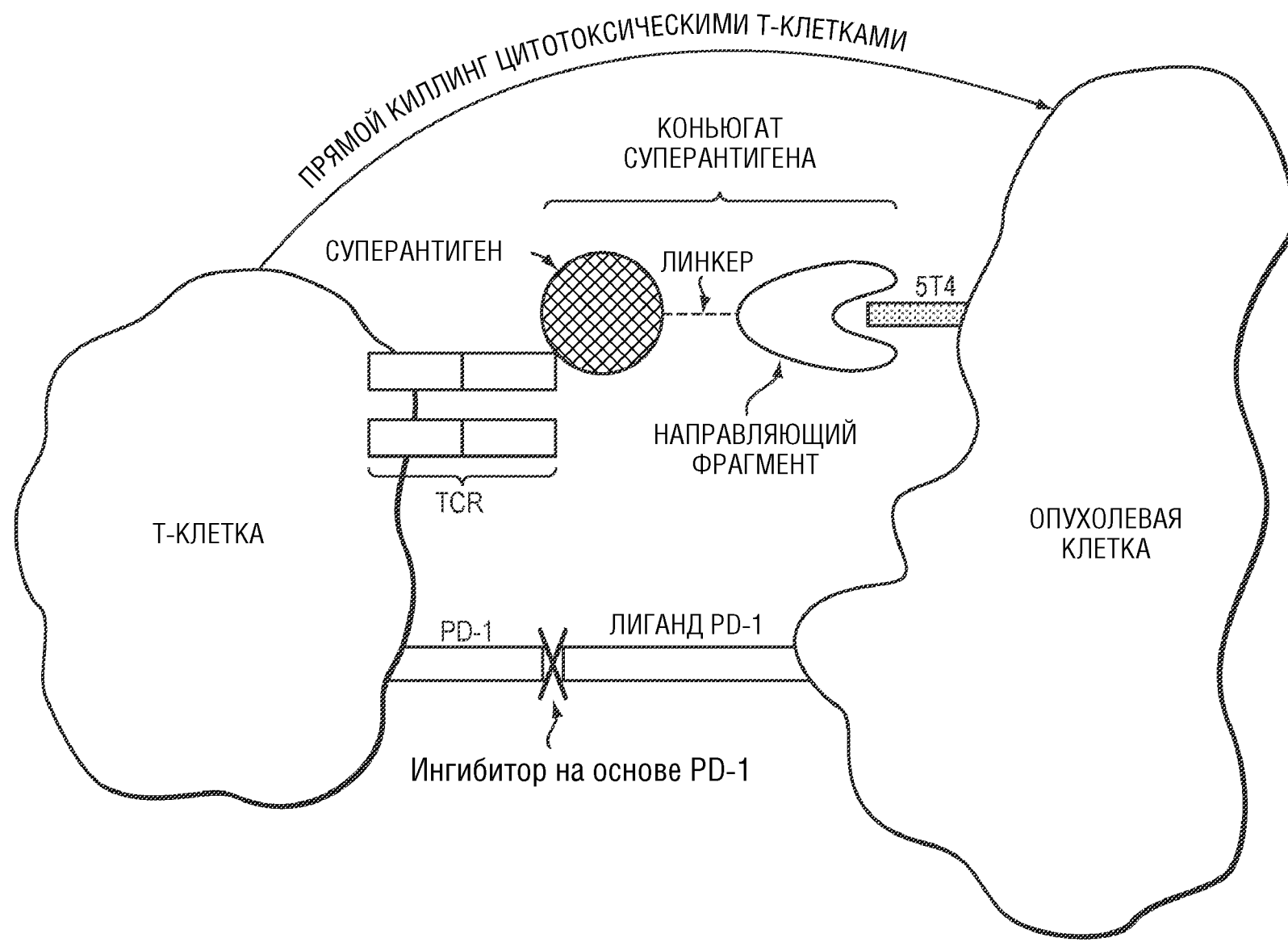
11. Суперантиген по п.10, где раковая клетка является клеткой рака толстой кишки или рака толстой и прямой кишки.
12. Суперантиген по любому из пп.1-11, где раковый антиген выбран из ЕрСАМ и 5Т4.
13. Суперантиген по п.12, где раковым антигеном является 5Т4.
14. Суперантиген по любому из пп.1-13, где иммунопотенциатор является ингибитором на основе PD-1.
15. Суперантиген по п.14, где ингибитор на основе PD-1 является ингибитором PD-1 или PD-L1.
16. Суперантиген по любому из пп.1-15, где субъект ранее получал другую противоопухолевую терапию.
17. Суперантиген по п.16, где рак является рефрактерным к противоопухолевой терапии.
18. Суперантиген по п.17, где рак рецидивировал после противоопухолевой терапии
19. Суперантиген по любому из пп.16-18, где противоопухолевая терапия включает Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR) или биспецифичный активатор Т-клеток (BiTE).
20. Суперантиген по любому из пп.1-19, где конъюгат суперантигена вводят субъекту до, одновременно или после ингибитора PD-1 или PD-L1.
21. Суперантиген по любому из пп.1-20, где суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологический вариант и/или фрагмент.
22. Суперантиген по любому из пп.1-21, где суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.
23. Суперантиген по любому из пп.1-22, где направляющий фрагмент является антителом.
24. Суперантиген по п.23 где антитело является антителом против 5Т4.
25. Способ по п.24, где антитело против 5Т4 включает Fab-фрагмент, связывающий раковый антиген 5Т4.
26. Суперантиген по п.25, где антитело против 5Т4 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-222 из SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 из SEQ ID NO:9.
27. Суперантиген по любому из пп.1-26, где конъюгат суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO:9.
28. Суперантиген по любому из пп.15-27, где ингибитор PD-1 является антителом против PD-1.
29. Суперантиген по п.28, где антитело против PD-1 выбрано из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба.

30. Суперантиген по любому из пп.15-29, где ингибитор PD-L1 является антителом против PD-L1.

31. Суперантиген по п.30, где антитело против PD-L1 выбрано из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

SEQ ID NO: 10 SEA/E-18

SEQ ID NO: 10 SEA/E-18

SEQ ID NO: 1 SEE

SEQ ID NO: 2 SEA

```

      A      B
SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYYNSKAITSSEKSADQFLTNTLLFKGFFTC 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTC 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQRNALSNLRQIYYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTC 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYYNEKAKTENKESHDQFLQHTILFKGFFTD 60
*****  **  **  *****  **  *  .  *  ****  .  *****

```

	<u>C</u>	
SEA/E-120	HPWYNDLLVDLGSTAATSEYEGSSVDLYGAYYGYYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEA/E-18	HPWYNDLLVDLGSKDATNKYKGKKVDLYGAYYGYYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEE	HPWYNDLLVDLGSKDATNKYKGKKVDLYGAYYGYYQCAGGTENKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEA	HSWYNDLLVFDSKDIVDKYKGKKVDLYGAYYGYYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
	* * * * *	

[illegible]

	<u>D</u>	<u>E</u>
SEA/E-120	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPDTLLRIYRDNTTISSTSLSLISLYLYTT	233
SEA/E-18	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPDTLLRIYRDNKTINSENLHIALYLYTT	233
SEE	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPDTLLRIYRDNKTINSENLHIDLYLYTT	233
SEA	RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQQYSNTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLYTS	233
	*****:* :* ***** :***** :***** :* :* :*****:	

ФИГ.3

SEQ ID NO: 7 1-50

Вариабельная область тяжелой цепи 5T4

EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYYMH WVKQS PGKGL EWIGR

51-100

INPNN GVTLY NQKFK DKATL TVDKS STTAY MELRS LTSED SAVYY CARST

Константная область тяжелой цепи C242

101-150

MITNY VMDYW GQGTG VTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK

151-200

GYFPE PVTVT WNSGS LSSGV HIFPA VLQSD LYILS SSVTV PSSTW PSETV

SEA/E-120

201-250

TCNVA HPASS TKVDK KIVPR DSGGP SEKSE EINEK DLRKK SELQG TALGN

251-300

LKQIY YYNSK AITSS EKSAD QFLTN TLLFK GFTTG HPWYN DLLVD LGSTA

301-350

ATSEY EGSSV DLYGA YYGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VTLHD NNRLT EEKKV

351-400

PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF

401-450

GGKVQ RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD AQQGY PDTLL RIYRD NTTIS STSLG

451-458

ISLYL YTT

Вариабельная область легкой цепи 5T4

459-500

SI VMTQT PLSLL VSAGD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ

501-550

SPKLL ISYTS SRYAG VPDRF SGSGY GTDET LTISS VQAED AAVYF CQQDY

Константная область легкой цепи C242

551-600

NSPPT FGGGT KLEIK RADAA PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFLN NFYPK

601-650

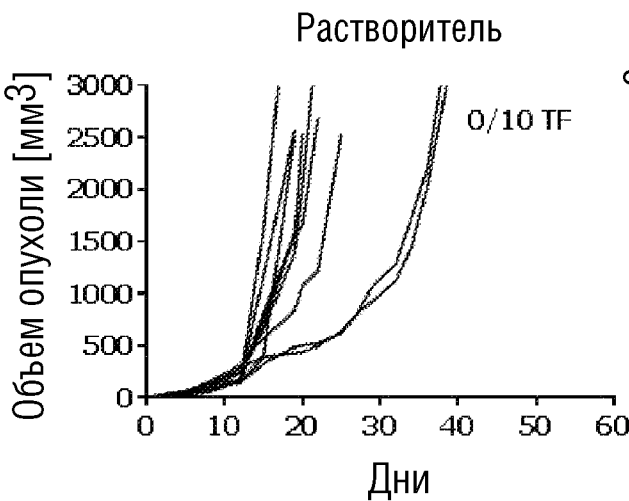
DINVK WKIDG SERQN GVLNS WTDQD SKDST YSMSS TLTLT KDEYE RHNSY

651-672

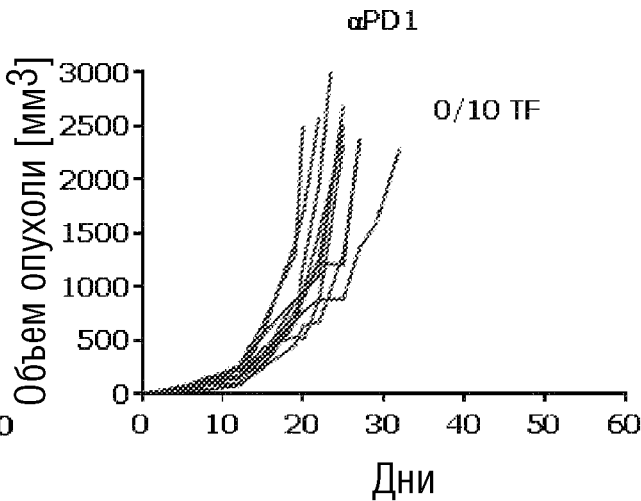
TCEAT HKTST SPIVK SENRN ES

ФИГ.4

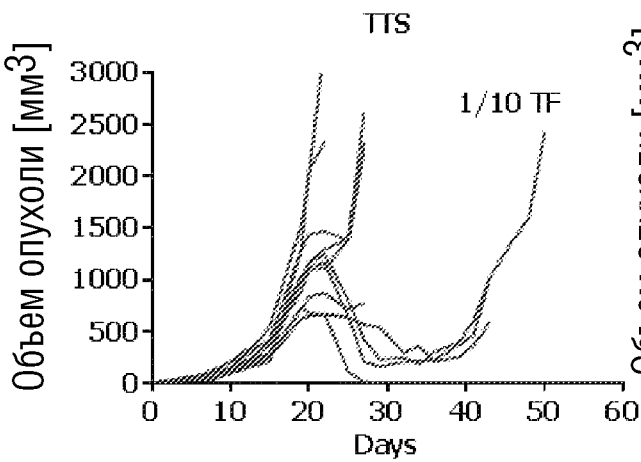
ФИГ.4А



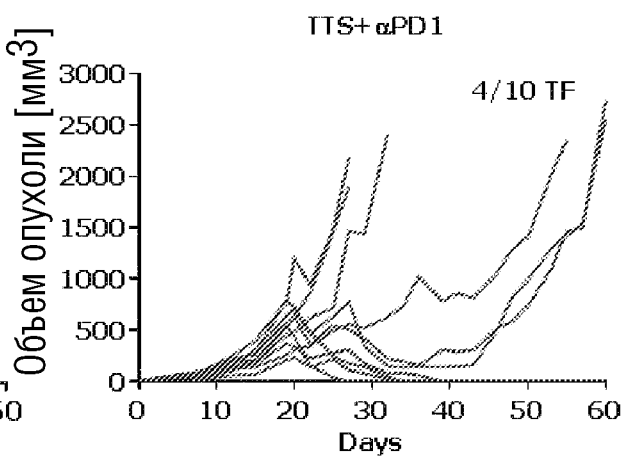
ФИГ.4В



ФИГ.4С



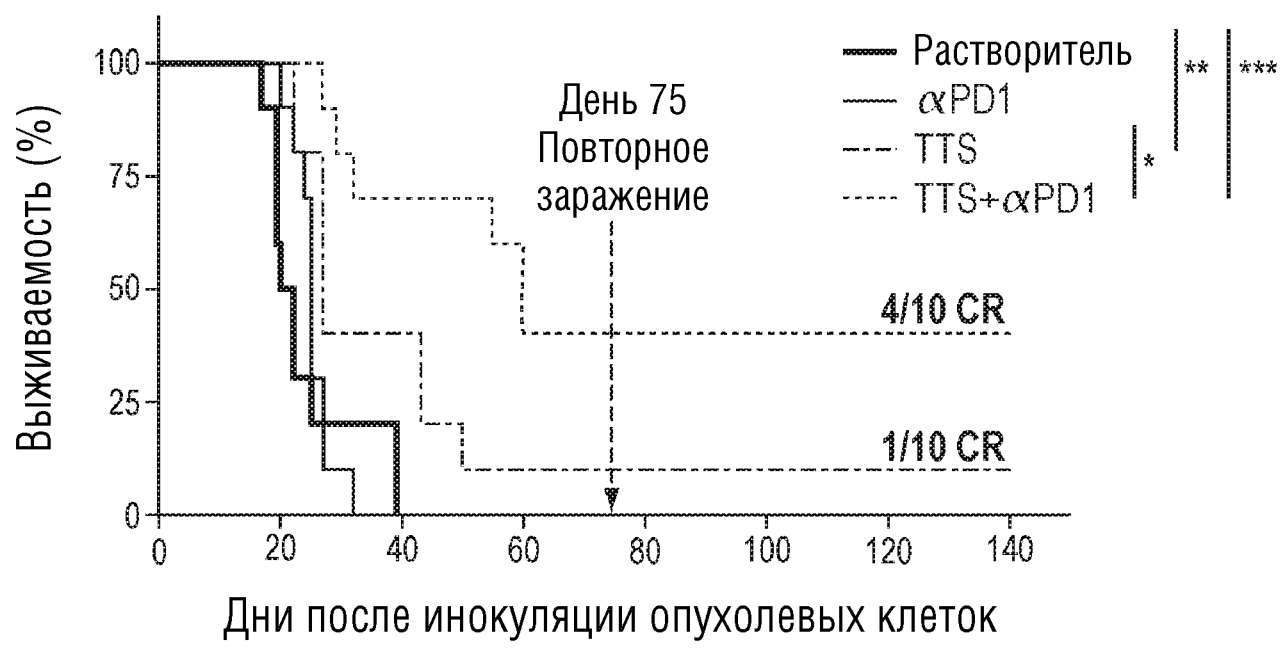
ФИГ.4D



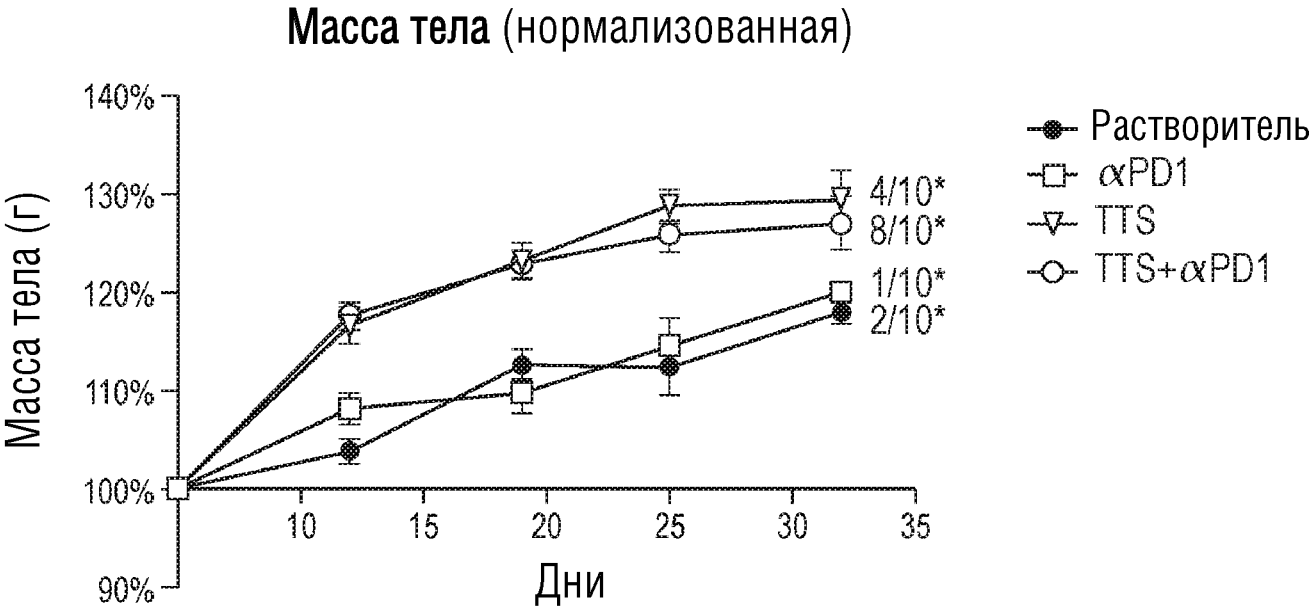
ФИГ.5



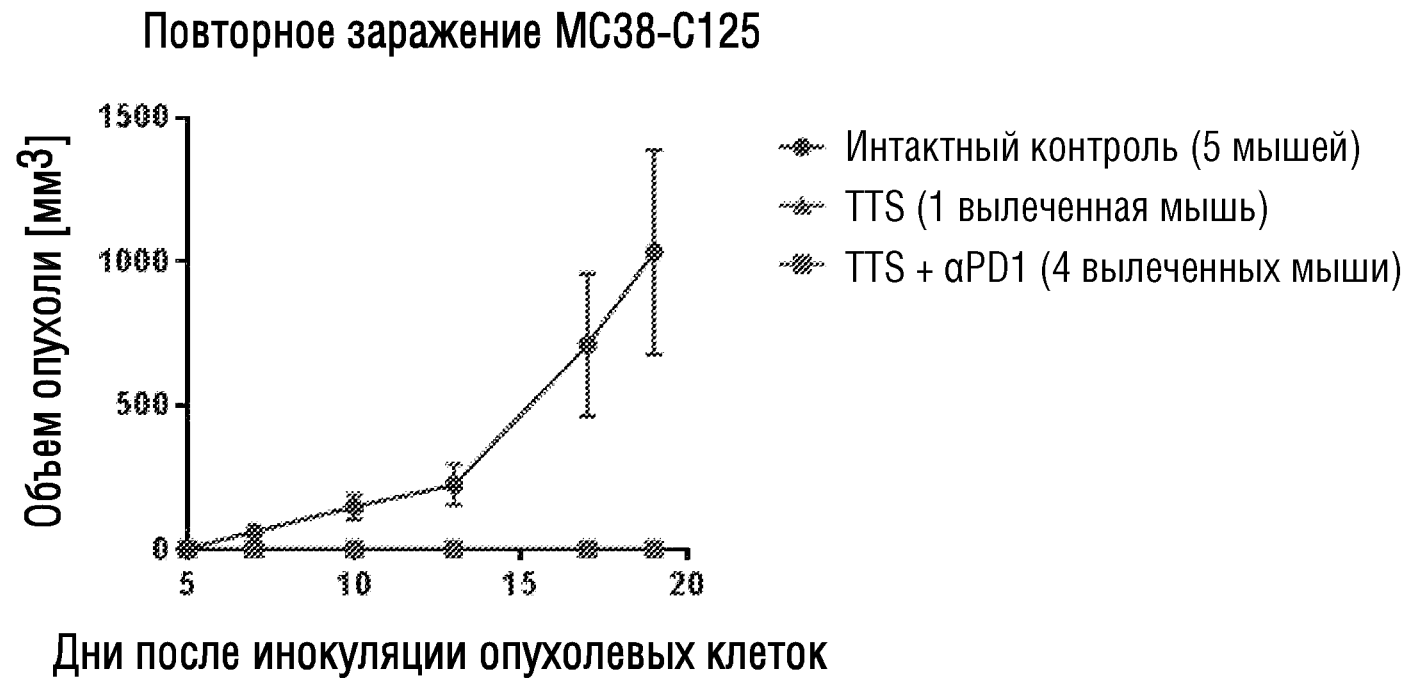
ФИГ.6



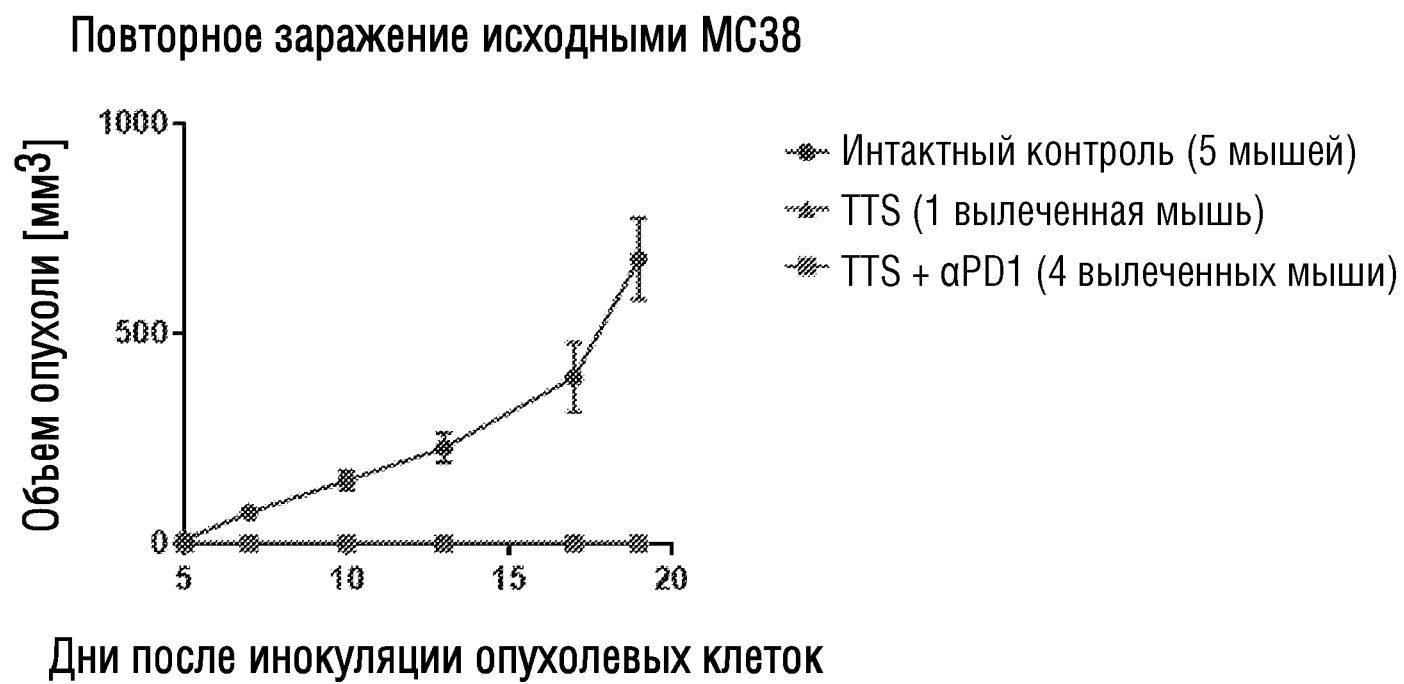
ФИГ.7



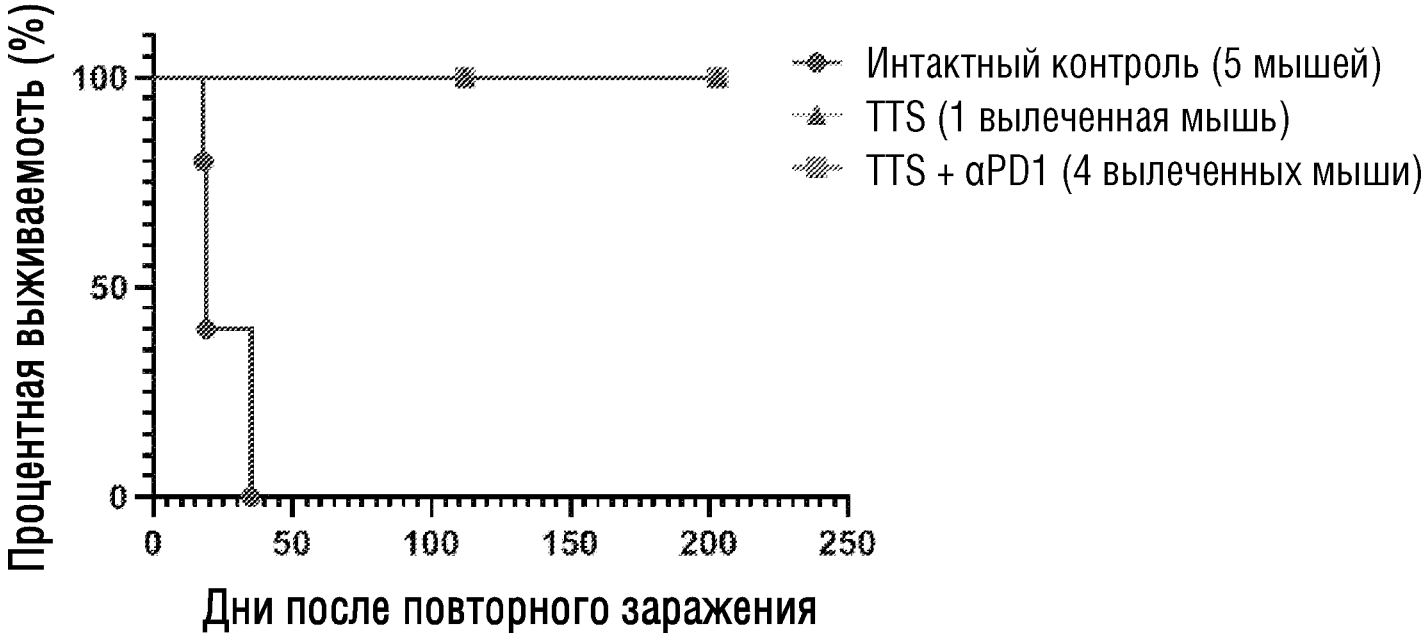
ФИГ.8



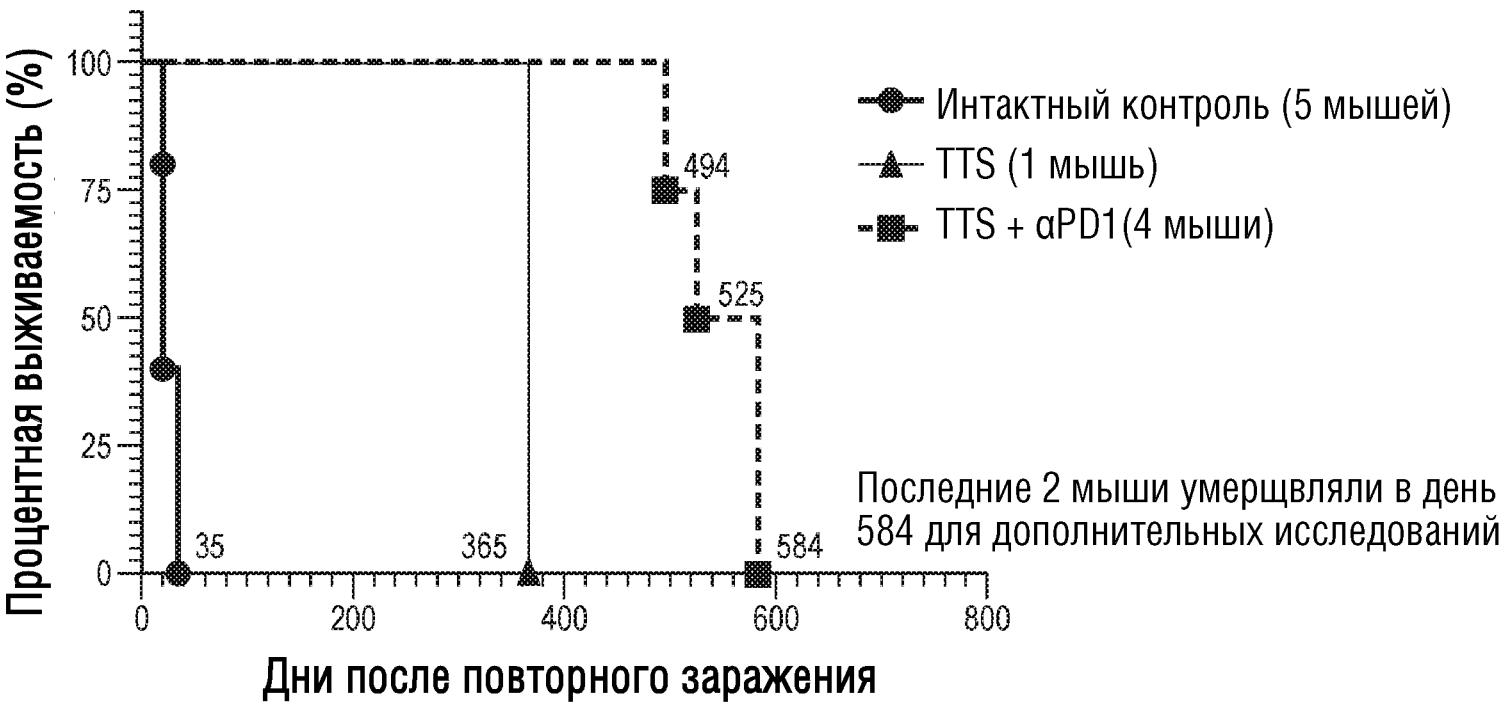
ФИГ.9

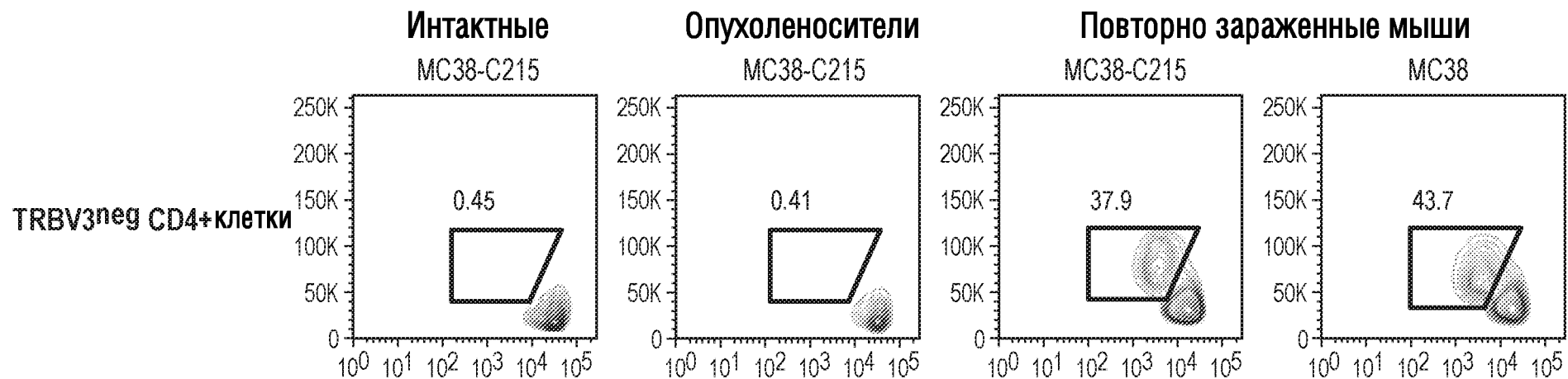


ФИГ.10А



ФИГ.10В



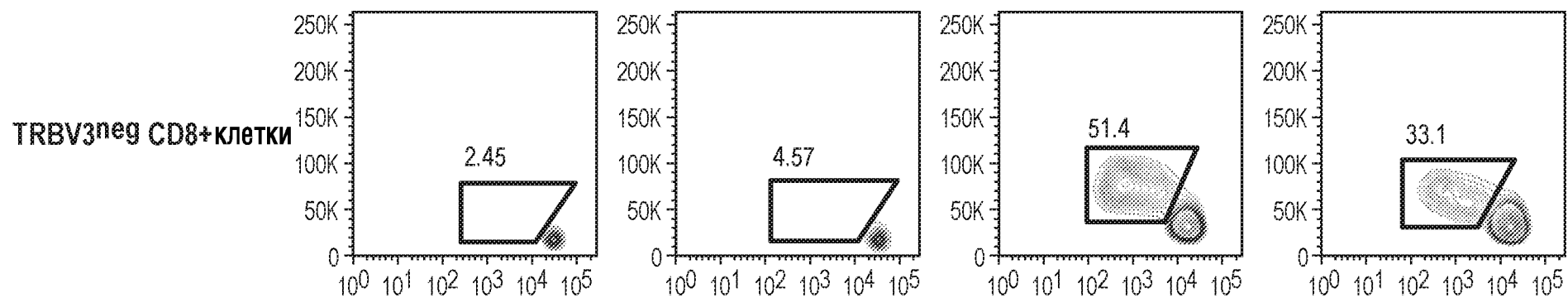


ФИГ.11А

ФИГ.11В

ФИГ.11С

ФИГ.11D



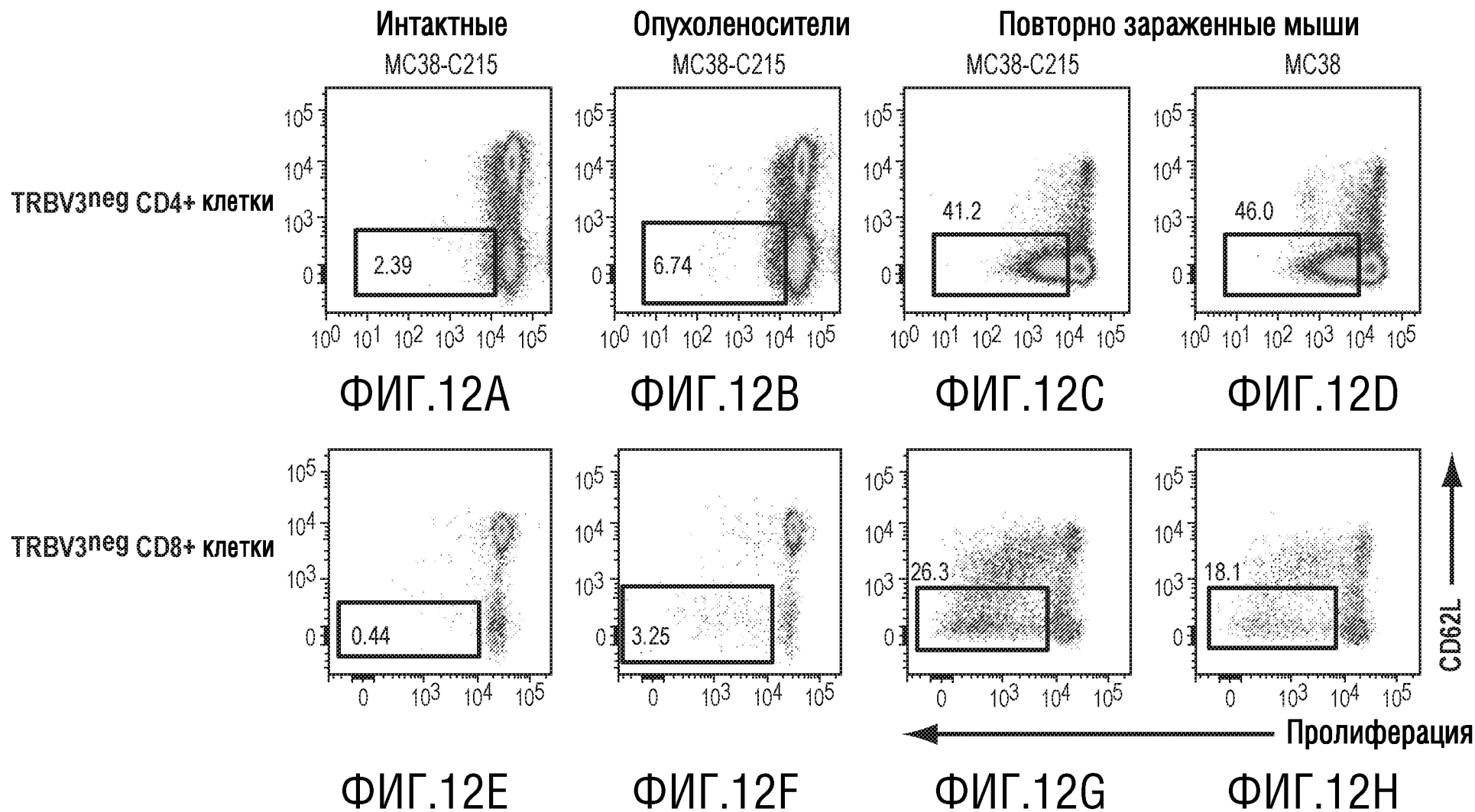
ФИГ.11Е

ФИГ.11F

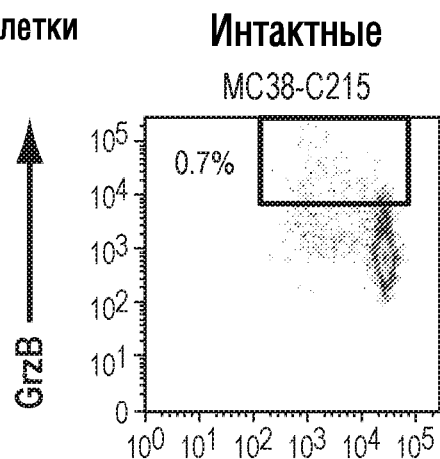
ФИГ.11G

ФИГ.11H

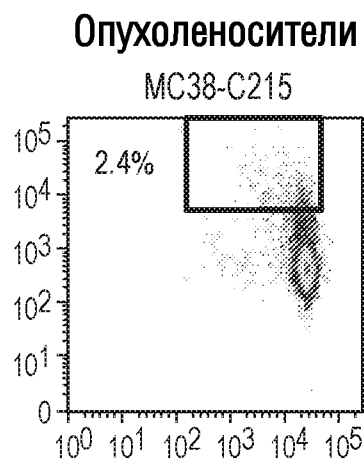
← Проллиферация



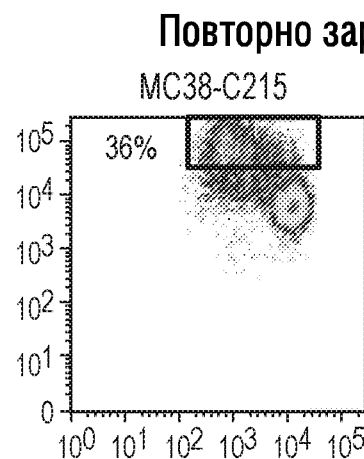
TRBV3^{neg} CD8⁺ клетки



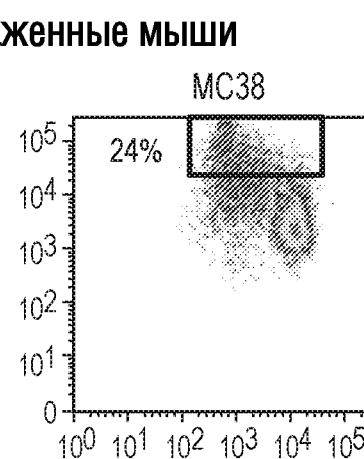
ФИГ.13А



ФИГ.13В



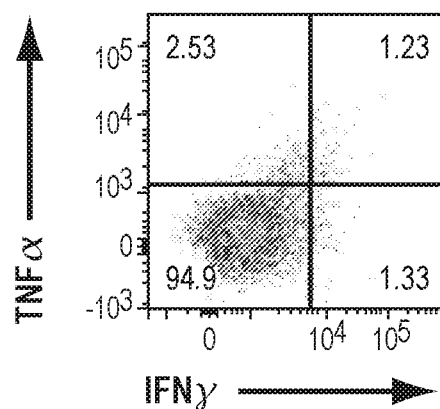
ФИГ.13С



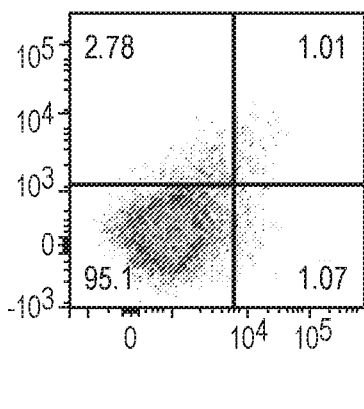
ФИГ.13D

← Проплиферация

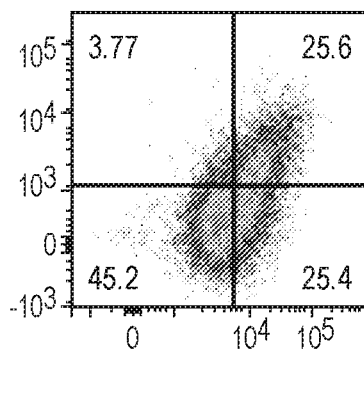
14/14



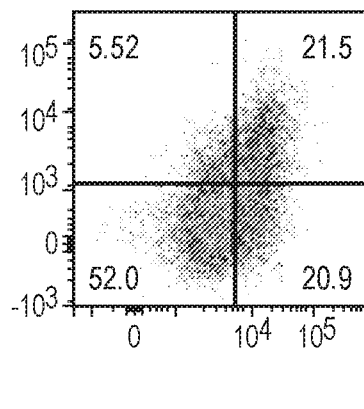
ФИГ.13Е



ФИГ.13F



ФИГ.13G



ФИГ.13H