

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292531** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.12.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.05

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ**

(31) 62/985,553

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.05

**Шахар Михал, Натан Ашер, Саги
Яэль (IL)**

(33) US

(86) PCT/IB2021/000934

(74) Представитель:

(87) WO 2022/074464 2022.04.14

Медведев В.Н. (RU)

(88) 2022.09.29

(71) Заявитель:

НЕОТКС ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (IL)

(57) Изобретение обеспечивает способы или композиции для лечения рака с использованием иммунной клетки, например Т-клетки, например CAR Т-клетки, необязательно в комбинации с конъюгатом суперантигена. Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения иммунных клеток, например Т-клеток, например CAR Т-клеток, для применения в лечении рака.

A1

202292531

202292531

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575581EA/019

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущества и приоритет предварительной патентной заявки США, серийный номер 62/985553, поданной 5 марта 2020 г., полное содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область изобретения

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам для лечения рака у субъекта, и, более конкретно, настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения рака с использованием иммунной клетки, необязательно в комбинации с конъюгатом суперантигена, и к способам получения иммунных клеток для применения при лечении рака.

Предпосылки создания изобретения

[0003] По данным Американского общества по борьбе с раком, каждый год более миллиона человек в Соединенных Штатах заболевают раком. Рак представляет собой заболевание, возникающее в результате неконтролируемой пролиферации клеток, которые когда-то были объектом естественных механизмов контроля, но были преобразованы в раковые клетки, которые продолжают неконтролируемо пролиферировать.

[0004] Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой синтетические рецепторы, которые перенацеливают иммунные клетки, например, Т-клетки, на антигены поверхности опухоли (Sadelain et al. (2003), Nat. Rev. Cancer. 3(1):35-45, Sadelain et al. (2013) Cancer Discovery 3(4):388-398). CAR обеспечивают функции связывания антигена, а также активации иммунных клеток. Первоначально CAR содержали опухоль-связывающий элемент на основе антител, такой как одноцепочечный Fv (scFv), который отвечает за распознавание антигена, связанного с CD3zeta или сигнальными доменами Fc-рецептора, которые запускают активацию Т-клеток. Более поздние конструкции CAR включали дополнительные активирующие и костимулирующие сигнальные домены, что привело к обнадеживающим результатам у пациентов с химиорефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями (Brentjens et al. (2013) Sci. Trans. Med. 5(177): 177ra38, Brentjens et al. (2011) Blood 118(18): 4817-4828, Davila et al. (2014) Sci. Trans. Med. 6(224): 224ra25, Grupp et al. (2013) N. Engl. J. Med. 368(16): 1509-1518, Kalos et al. (2011) Sci. Trans. Med. 3(95): 95ra73). CAR терапии были одобрены для лечения подмножества пациентов с рецидивирующей или рефрактерной В-клеточной крупноклеточной лимфомой и подмножества пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ALL). Однако CAR терапии, нацеленные на солидные опухоли, оказались более сложными (см., например, Martinez et al. (2019) Front Immunol 10:128).

[0005] Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении и излечении рака, по-прежнему существует постоянная потребность в новых и эффективных терапиях для

лечения рака и излечения рака.

Сущность изобретения

[0006] Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против рака у субъекта может быть усилен путем комбинирования конъюгата суперантигена, включающего суперантиген (например, сконструированный суперантиген стафилококковый энтеротоксин SEA/E-120), ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает раковый антиген с иммунной клеткой (например, Т-клеткой, например, Т-клеткой с химерным антигенным рецептором (CAR)). Кроме того, было обнаружено, что противораковое лечение с использованием конъюгата суперантигена и иммунных клеток может быть усилено за счет использования иммунных клеток, экспрессирующих Т-клеточные рецепторы, которые связываются с суперантигеном (например, Т-клеточные рецепторы, включающие β -переменную 7-9 Т-клеточного рецептора (TRBV7-9)).

[0007] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества иммунной клетки (например, выделенной иммунной клетки), включающей экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

[0008] В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

[0009] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-5Т4 антитело, например, анти-5Т4 антитело, включающее Fab-фрагмент, который связывает раковый антиген 5Т4. В некоторых вариантах осуществления анти-5Т4 антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-458 SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 SEQ ID NO: 9.

[0010] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 9.

[0011] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка (например, выделенная иммунная клетка) выбрана из Т-клетки, натуральной киллерной клетки (NK) и натуральной Т-киллерной клетки (NKT). В некоторых вариантах осуществления

иммунная клетка (например, выделенная иммунная клетка) представляет собой Т-клетку, например, Т-клетку, включающую Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

[0012] В некоторых вариантах осуществления первый и второй раковый антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй раковый антиген являются разными. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй раковый антиген выбраны из 5T4, мезотелина, простатспецифического мембранного антигена (PSMA), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), карбоангидразы IX (CAIX), карцино-эмбрионального антигена (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD47, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиального гликопротеина 2 (EGP 2), эпителиального гликопротеина-40 (EGP-40), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), фолат-связывающего белка (FBP), фетального ацетилхолинового рецептора (AChR), фолатного рецептора- α и β (FR α и β), ганглиозида G2 (GD2), ганглиозида G3 (GD3), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER-2/ERB2), рецептора эпидермального фактора роста ν III (EGFR ν III), ERB3, ERB4, обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), альфа-2 субъединицы рецептора интерлейкина 13 (IL-13Ra2), К-легкой цепи, рецептора домена вставки киназы (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), молекулы клеточной адгезии L1 (L1CAM), ассоциированного с меланомой антигена 1 (семейство меланомных антигенов A1, MAGE-A1), муцина 16 (MUC-16), муцина 1 (MUC-1), лигандов KG2D, раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1, опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), фактора роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белка опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранной рецепторной протеинтирозинкиназы 1 типа (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфат протеогликана-4 (CSPG4), вспомогательной молекулы DNAX (DNAM-1), рецептора 2 эфрина типа A (EphA2), ассоциированного с фибробластами белка (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикана 3 (GPC3), HA-III, HERK-V, IL-1 IR α , латентного мембранного белка 1 (LMP1), молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56), лиганда 1 рецептора запрограммированной гибели клеток (PD-L1), В-клеточного антигена созревания (BCMA) и Trail-рецептора (TRAIL R). В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй раковый антиген выбран из 5T4, EpcAM, HER2, EGFR ν iii и IL13Ra2, например, первый раковый антиген представляет собой 5T4.

[0013] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена и иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку) вводят отдельно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена и иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку) вводят в комбинации. В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена и иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку) вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена и иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку) вводят в разное время.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает

введение субъекту ингибитора на основе PD-1, например, ингибитора PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, например, анти-PD-1 антитело, выбранное из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело, например, анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

[0015] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую: (i) конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; (ii) иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку), включающую экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

[0016] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ размножения Т-клеток (например, выделенных Т-клеток), включающих Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. Способ включает контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (АРС). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0017] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки (например, выделенной Т-клетки) для применения при лечении субъекта. Способ включает контактирование Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (АРС). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0018] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-

клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает: (a) контактирование Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II; и (b) модификацию Т-клеток для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0019] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает: (a) модификацию Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR); и (b) контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0020] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает модификацию Т-клеток (например, выделенных Т-клеток) для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), при этом Т-клетки контактировали с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II. В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0021] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает контактирование Т-

клеток (например, выделенных Т-клеток) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II, при этом Т-клетки были модифицированы для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (АРС). В некоторых вариантах осуществления клетка, включающая МНС класса II, представляет собой моноцит и/или В-клетку.

[0022] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает (i) Т-клетку (например, выделенную Т-клетку), (ii) CAR Т-клетку (например, выделенную CAR Т-клетку), (iii) популяцию Т-клеток (например, популяцию выделенных Т-клеток) или (iv) популяцию CAR Т-клеток (например, популяцию выделенных CAR Т-клеток), полученных любым из вышеуказанных способов. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанных Т-клеток или CAR Т-клеток или популяции Т-клеток или CAR Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение субъекту эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

[0023] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую Т-клетки (например, выделенные Т-клетки), где по меньшей мере 10% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20%, 30% или 40% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

[0024] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает Т-клетку (например, выделенную Т-клетку), модифицированную для повышения экспрессии TRBV7-9 по сравнению с Т-клеткой, которая не была модифицирована. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую TRBV7-9. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно

включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и/или (ii) эффективного количества вышеуказанной Т-клетки.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных способов лечения рака, рак выбирают из рака, экспрессирующего 5T4, мезотелин, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), карбоангидразу IX (CAIX), карцино-эмбриональный антиген (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD47, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиальный гликопротеин 2 (EGP 2), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), фолат-связывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор (AChR), фолатный рецептор- α и β (FR α и β), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид G3 (GD3), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER-2/ERB2), рецептор эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII), ERB3, ERB4, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), альфа-2 субъединицу рецептора интерлейкина 13 (IL-13R α 2), К-легкую цепь, рецептор домена вставки киназы (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), молекулу клеточной адгезии L1 (L1CAM), ассоциированный с меланомой антиген 1 (семейство меланомных антигенов A1, MAGE-A1), муцин 16 (MUC-16), муцин 1 (MUC-1), лиганды KG2D, раково-тестикулярный антиген NY-ESO-1, опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), фактор роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белок опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранную рецепторную протеинтирозинкиназу 1 типа (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфат протеогликан-4 (CSPG4), вспомогательную молекулу DNAX (DNAM-1), рецептор 2 эфрина типа А (EphA2), ассоциированный с фибробластами белок (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикан 3 (GPC3), HA-III, HERK-V, IL-1 IR α , латентный мембранный белок 1 (LMP1), молекулу адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56), лиганд 1 рецептора запрограммированной гибели клеток (PD-L1), В-клеточный антиген созревания (BCMA) и Trail-рецептор (TRAIL R), или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака, экспрессирующего 5T4, EpcAM, HER2, EGFRvIII и IL13R α 2, например, рак представляет собой рак, экспрессирующий 5T4.

[0026] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных способов лечения рака рак включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака

поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака и рака кожи.

[0027] Эти и другие аспекты и признаки изобретения описаны в нижеследующем подробном описании и формуле изобретения.

Описание чертежей

[0028] Настоящее изобретение можно более полно понять со ссылкой на следующие чертежи.

[0029] **Фиг. 1** представляет выравнивание последовательностей, показывающее гомологичные области А-Е в некоторых суперантигенах дикого типа и модифицированных.

[0030] **Фиг. 2** представляет аминокислотную последовательность, соответствующую иллюстративному конъюгату суперантигена, наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], который включает две белковые цепи. Первая белковая цепь включает остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 (см. также, SEQ ID NO: 8) и включает тяжелую цепь химерного 5T4 Fab, соответствующую остаткам 1-222 SEQ ID NO: 7, и суперантиген SEA/E-120, соответствующий остаткам 226-458 SEQ ID NO: 7, ковалентно связанные через трипептидный линкер, 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 5T4 Fab. Две белковые цепи удерживаются вместе за счет нековалентных взаимодействий между тяжелой и легкой цепями Fab.

[0031] **Фиг. 3** представляет схематическое изображение иллюстративного конъюгата суперантигена наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®].

[0032] **Фиг. 4** представляет гистограмму, иллюстрирующую эффект CAR Т-клеток в комбинации с нацеленным на опухоль суперантигеном, представляющим собой наптумомаб эстафенатокс ("NAP"), на жизнеспособность клеточной линии опухоли головы и шеи FaDu. Жизнеспособность клеток FaDu измеряли после 4-часового совместного культивирования либо с Her2 CAR Т-клетками ("CAR Т"), либо с CAR Т-клетками отрицательного контроля ("Т-клетки") в присутствии или в отсутствие NAP (0,1 нг/мл). Жизнеспособность нормализовали до значений необработанного контроля ("отсутствие Т-клеток"). Результаты показаны слева направо для: необработанного контроля ("отсутствие Т-клеток"); CAR Т-клеток отрицательного контроля ("Т-клетки") без NAP; CAR Т-клеток отрицательного контроля ("Т-клетки") с 0,1 нг/мл NAP; Her2 CAR Т-клеток с электроосажденной CAR мРНК 0,25 мкг ("CAR Т") без NAP; и Her2 CAR Т-клеток с электроосажденной CAR мРНК 0,25 мкг ("CAR Т") с 0,1 нг/мл NAP. Среднее значение \pm SD (стандартное отклонение); однофакторный дисперсионный анализ (***) $p=0,0007$ по сравнению с контролем, **** $p<0,0001$ по сравнению со всеми исследуемыми группами, NS=незначимый); #=CAR Т-клетки, выращенные в присутствии α CD3 и α CD28 антител; &=CAR Т-клетки или Т-клетки, выращенные в присутствии NAP.

[0033] **Фиг. 5** иллюстрирует влияние различных способов активации CAR Т-клеток на экспрессию CAR. Экспрессию меченого CAR в активированных CAR Т-клетках

анализировали методом проточной цитометрии. В таблице показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI), указывающая на экспрессию CAR после указанного способа активации.

[0034] **Фиг. 6** иллюстрирует процент TRBV7-9-экспрессирующих CD8⁺ Т-клеток, выращенных в указанных условиях активации. TRBV7-9 окрашивали мультимером NAP-PE и анализировали методом проточной цитометрии.

[0035] **Фиг. 7** представляет гистограмму, иллюстрирующую эффект различных способов активации CAR-Т-клеток на активность CAR Т-клеток, измеренный по жизнеспособности клеточной линии FaDu опухолей головы и шеи после обработки CAR-Т-клетками. Показатели выживаемости клеток FaDu измеряли после 4-часового совместного культивирования с CAR Т-клетками Her2, которые были активированы указанным способом. Выживаемость (жизнеспособность) нормализовали до значений необработанного контроля (“отсутствие CAR Т-клеток”). Результаты показаны слева направо для: необработанного контроля (“отсутствие CAR Т-клеток”); CAR Т-клеток, выращенных в присутствии αCD3 и IL2; CAR Т-клеток, выращенных в присутствии αCD3, αCD28 и IL2; CAR Т-клеток, выращенных в присутствии NAP (1 мкг/мл) и IL2; и CAR Т-клеток, выращенных в присутствии NAP (10 мкг/мл) и IL2. n=4; Среднее значение ± SD; однофакторный дисперсионный анализ (**** p < 0,0001 по сравнению с CD3 или CD3/CD28).

[0036] **Фиг. 8** иллюстрирует эффект различных способов активации CAR Т-клеток на экспрессию INFγ и маркера дегрануляции CD107a. Опухолевые клетки FaDu инкубировали с CD8⁺ CAR Т-клетками, активированными указанным способом, в течение 4 часов. Контрольные Т-клетки инкубировали отдельно без каких-либо клеток-мишеней. После этого CD8⁺ CAR Т-клетки окрашивали и анализировали на экспрессию INFγ и CD107a методом проточной цитометрии (**Фиг. 8А**). Представлен процент CD8⁺ CAR Т-клеток, экспрессирующих INFγ (**Фиг. 8В**, слева) и CD107a (**Фиг. 8В**, справа). Результаты показаны слева направо для: CAR Т-клеток, выращенных в присутствии αCD3 и IL2; CAR Т-клеток, выращенных в присутствии αCD3, αCD28 и IL2; CAR Т-клеток, выращенных в присутствии NAP (1 мкг/мл) и IL2; и CAR Т-клеток, выращенных в присутствии NAP (10 мкг/мл) и IL2.

[0037] **Фиг. 9** представляет гистограмму, иллюстрирующую эффект CAR Т-клеток в комбинации либо с NAP, либо с неконъюгированным суперантигеном стафилококкового энтеротоксина (SEA) на жизнеспособность клеточной линии опухоли головы и шеи FaDu. Показатели выживаемости клеток FaDu измеряли после 4-часового совместного культивирования с Her2 CAR Т-клетками, которые были активированы указанным способом. Выживаемость (жизнеспособность) нормализовали до значений необработанного контроля. Результаты показаны слева направо для: отсутствия обработки Т-клетками (“контроль”); CAR Т-клеток без NAP или SEA (“CAR Т”); CAR Т-клеток с 0,01 нг/мл NAP (“CAR Т+NAP”); CAR Т-клеток с 0,01 нг/мл SEA (“CAR Т+SEA”). Среднее значение ± SD; однофакторный дисперсионный анализ (**** p < 0,0001 по

сравнению со всеми исследуемыми группами, NS=незначимый); [#]=CAR T-клетки, выращенные в присутствии α CD3 и α CD28 антител; [&]=CAR T-клетки, выращенные в присутствии 10 мкг/мл NAP; ^λ=CAR T-клетки, выращенные в присутствии 10 нг/мл SEA.

Подробное описание изобретения

[0038] Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против рака у субъекта может быть усилен путем комбинирования конъюгата суперантигена, включающего суперантиген (например, сконструированный суперантиген стафилококкового энтеротоксина SEA/E-120), ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает раковый антиген с иммунной клеткой (например, T-клеткой, например, T-клеткой с химерным антигенным рецептором (CAR)). Кроме того, было обнаружено, что противораковое лечение с использованием конъюгата суперантигена и иммунных клеток может быть усилено за счет использования иммунных клеток, экспрессирующих T-клеточные рецепторы, которые связываются с суперантигеном (например, T-клеточные рецепторы, включающие β -переменную 7-9 T-клеточного рецептора).

[0039] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества иммунной клетки (например, выделенной иммунной клетки), включающей экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

[0040] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую: (i) конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; (ii) иммунную клетку (например, выделенную иммунную клетку), включающую экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

[0041] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ размножения T-клеток (например, выделенных T-клеток), включающих T-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. Способ включает контактирование T-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин A или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс

гистосовместимости (МНС) класса II.

[0042] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки (например, выделенной Т-клетки) для применения в лечении субъекта. Способ включает контактирование Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

[0043] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает: (a) контактирование Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II; и (b) модификацию Т-клеток для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0044] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает: (a) модификацию Т-клеток (например, Т-клеток, выделенных у субъекта) для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR); и (b) контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

[0045] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает модификацию Т-клеток (например, выделенных Т-клеток) для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), при этом Т-клетки подвергались контактированию с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

[0046] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Способ включает контактирование Т-клеток (например, выделенных Т-клеток) с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и/или (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II, при этом Т-клетки были модифицированы для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0047] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает Т-клетку (например, выделенную Т-клетку) или CAR Т-клетку (например, выделенную CAR Т-клетку), полученную любым из вышеуказанных способов. В другом аспекте настоящее

изобретение обеспечивает популяцию Т-клеток (например, популяцию выделенных Т-клеток) или популяцию CAR Т-клеток (например, популяцию выделенных CAR Т-клеток), полученных любым из вышеуказанных способов. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанной Т-клетки или CAR Т-клетки или популяции Т-клеток или CAR Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение субъекту эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

[0048] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую Т-клетки (например, выделенные Т-клетки), где по меньшей мере 10% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

[0049] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает Т-клетку (например, выделенную Т-клетку), модифицированную для повышения экспрессии TRBV7-9 по сравнению с Т-клеткой, которая не была модифицирована. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую TRBV7-9. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и/или (ii) эффективного количества вышеуказанной Т-клетки.

[0050] Различные признаки и аспекты настоящего изобретения обсуждаются более подробно ниже.

I. Определения

[0051] Если не указано иное, используемые в настоящей заявке технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Для целей настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

[0052] При использовании в настоящей заявке “а” или “an” могут означать один или несколько. Например, такое утверждение, как “лечение суперантигеном и иммунной клеткой” может означать лечение: одним суперантигеном и иммунной клеткой; более чем

одним суперантигеном и одной иммунной клеткой; одним суперантигеном и более чем одной иммунной клеткой; или более чем одним суперантигеном и более чем одной иммунной клеткой.

[0053] В контексте настоящей заявки, 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, полученное методом фагового дисплея, включая полностью человеческое антитело, полусинтетическое антитело или полностью синтетическое антитело), которое было оптимизировано, сконструировано или химически конъюгировано. Примерами оптимизированных антител являются антитела с созревшей аффинностью. Примерами сконструированных антител являются Fc-оптимизированные антитела, антитела, сконструированные для снижения иммуногенности и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела). Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечные антитела (например, scFv), миниантитела и диатела. Антитело, конъюгированное с токсинным фрагментом, является примером химически конъюгированного антитела.

[0054] В контексте настоящей заявки термины “рак” и “раковый” означают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, меланому, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные заболевания. Более конкретные примеры рака включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, гастриальный рак или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак кости, рак головного мозга, ретинобластому, рак эндометрия или карциному матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, карциному полового члена, тестикулярный рак, а также рак головы и шеи, рак десен или языка. Рак включает рак или раковые клетки, например, рак может включать множество отдельных раковых или злокачественных клеток, например, лейкоз или опухоль, включающую множество ассоциированных раковых или злокачественных клеток.

[0055] В контексте настоящей заявки термин “рефрактерный” относится к раку, который не реагирует на лечение или больше не поддается лечению. 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. В контексте настоящей заявки термин “повторное появление” или “рецидив” относится к возвращению рефрактерного рака или к признакам и симптомам рефрактерного рака после положительного ответа на предшествующее лечение (например, уменьшение опухолевой массы, уменьшение объема опухоли, уменьшение метастазирования опухоли или модуляция биомаркера, указывающее на положительный ответ на лечение).

[0056] В контексте настоящей заявки термин “иммуноген” представляет собой молекулу, которая стимулирует (побуждает, индуцирует или вызывает) иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать выработку антител, активацию определенных клеток, таких как, например, специфические иммунологически-компетентные клетки, либо и то и другое. Иммуноген может быть получен из многих типов веществ, таких как, но не ограничиваясь этим, молекулы из организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, убитые или инактивированные целые клетки или лизаты, синтетические молекулы и широкое разнообразие других агентов, как биологических, так и небιологических. Понятно, что практически любая макромолекула (включая встречающиеся в природе макромолекулы или макромолекулы, полученные методами рекомбинантной ДНК), включая практически все белки, может служить иммуногеном.

[0057] В контексте настоящей заявки термин “иммуногенность” относится к способности иммуногена стимулировать (побуждать, индуцировать или вызывать) иммунный ответ. Различные молекулы могут иметь разную степень иммуногенности, и известно, например, что молекула, имеющая более высокую иммуногенность по сравнению с другой молекулой, способна стимулировать (побуждать, индуцировать или вызывать) более сильный иммунный ответ, чем агент, обладающий меньшей иммуногенностью.

[0058] В контексте настоящей заявки термин “антиген” относится к молекуле, которая распознается антителами, специфическими иммунологически-компетентными клетками или теми и другими. Антиген может быть получен из многих типов веществ, таких как, но не ограничиваясь этим, молекулы из организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, нуклеиновые кислоты, липиды, убитые или инактивированные целые клетки или лизаты, синтетические молекулы и широкий спектр других веществ, как биологических, так и не биологических.

[0059] В контексте настоящей заявки термин “антигенность” относится к способности антигена быть распознанным антителами, специфическими иммунологически компетентными клетками или теми и другими.

[0060] В контексте настоящей заявки термин “распространение эпитопа” относится к диверсификации эпитопной специфичности иммунного ответа от первоначального эпитоп-специфического иммунного ответа, направленного против антигена, на другие эпитопы на этом антигене (внутримолекулярное распространение) или другие антигены (межмолекулярное распространение). Распространение эпитопа позволяет иммунной

системе субъекта определять дополнительные эпитопы-мишени, первоначально не распознаваемые иммунной системой, в ответ на исходный терапевтический протокол, уменьшая при этом возможность ускользающих вариантов в опухолевой популяции и, таким образом, влияя на прогрессирование заболевания.

[0061] В контексте настоящей заявки 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, НКТ-клетка, НК-клетка, базофил, эозинофил или нейтрофил, на стимул. В некоторых вариантах осуществления ответ является специфическим для определенного антигена (“антиген- специфический ответ”) и относится к ответу CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток или В-клеток через их антигенспецифический рецептор. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ, такой как CD4⁺ ответ или CD8⁺ ответ. Такие ответы этих клеток могут включать, например, цитотоксичность, пролиферацию, продукцию цитокинов или хемокинов, транспортировку или фагоцитоз и могут зависеть от природы иммунных клеток, демонстрирующих ответ.

[0062] В контексте настоящей заявки термин “главный комплекс гистосовместимости” или “МНС” относится к определенному кластеру 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 в основном при презентации антигена CD8⁺ Т-лимфоцитам (CD8⁺ Т-клеткам). МНС класса II, или МНС-II, функционируют в основном при презентации антигена CD4⁺ Т-лимфоцитам (CD4⁺ Т-клеткам).

[0063] В контексте настоящей заявки термин “происходящий”, например, “происходящий из”, включает, но не ограничивается этим, например, молекулы дикого типа, полученные из биологических хозяев, таких как бактерии, вирусы и эукариотические клетки и организмы и модифицированные молекулы, например, модифицированные химическими средствами или полученные в рекомбинантных системах экспрессии.

[0064] В контексте настоящей заявки термины “серореактивный”, “серореакция” или “серореактивность” означают способность агента, такого как молекула, реагировать с антителами в сыворотке млекопитающего, такого как, но не ограничиваясь этим, человек. Это включает реакции со всеми типами антител, включая, например, антитела, специфические в отношении молекулы, и неспецифические антитела, связывающиеся с молекулой, независимо от того, инактивируют ли антитела или нейтрализуют агент. Как известно в данной области техники, разные агенты могут иметь различную серореактивность по отношению друг к другу, при этом агент, имеющий более низкую серореактивность, чем у другого, будет, например, реагировать с меньшим количеством антител и/или иметь более низкую аффинность и/или авидность к антителам, чем агент, имеющий более высокую серореактивность. Это может также включать способность

агента вызывать иммунный ответ антител у животного, такого как млекопитающее, такое как человек.

[0065] В контексте настоящей заявки термины “растворимый Т-клеточный рецептор” или “растворимый TCR” означают “растворимый” Т-клеточный рецептор, включающий цепи полноразмерного (например, связанного с мембраной) рецептора, за исключением того, что трансмембранная область цепей рецептора делетирована или мутирована, так что рецептор, когда он экспрессируется клеткой, не будет встраиваться в мембрану, проходить через нее или иным образом ассоциироваться с ней. Растворимый Т-клеточный рецептор может включать только внеклеточные домены или внеклеточные фрагменты доменов рецептора дикого типа (например, не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов).

[0066] В контексте настоящей заявки термин “суперантиген” означает класс молекул, которые стимулируют подмножество Т-клеток путем связывания с молекулами МНС класса II и V β доменами Т-клеточных рецепторов, тем самым активируя Т-клетки, экспрессирующие конкретные сегменты гена V β . Термин включает суперантигены дикого типа, встречающиеся в природе суперантигены, например, те, которые выделены из определенных бактерий или экспрессированы из немодифицированных генов из этих бактерий, а также модифицированные суперантигены, при этом, например, последовательность ДНК, кодирующая суперантиген, была модифицирована, например, методом генной инженерии, например, чтобы получить слитый белок с нацеливающим фрагментом и/или изменить определенные свойства суперантигена, такие как, но не ограничиваясь этим, 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 и любые иммунологически реактивные варианты и/или их фрагменты, описанные в настоящей заявке или в следующих патентах и патентных заявках США: Патенты США №№ 5858363, 6197299, 6514498, 6713284, 6692746, 6632640, 6632441, 6447777, 6399332, 6340461, 6338845, 6251385, 6221351, 6180097, 6126945, 6042837, 6713284, 6632640, 6632441, 5859207, 5728388, 5545716, 5519114, 6926694, 7125554, 7226595, 7226601, 7094603, 7087235, 6835818, 7198398, 6774218, 6913755, 6969616 и 6713284, патентные заявки США №№ 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190, 2002/0051765 и 2001/0046501 и Публикация международной заявки РСТ номер WO/03/094846.

[0067] В контексте настоящей заявки термин “нацеливающий фрагмент” относится к любой структуре, молекуле или фрагменту, которые способны связываться с клеточной молекулой, например, молекулой клеточной поверхности, предпочтительно молекулой, специфической для заболевания, такой как антиген, экспрессируемый преимущественно на раковой (или злокачественной) клетке. Примеры нацеливающих фрагментов включают, но не ограничиваются этим, антитела (включая их антигенсвязывающие фрагменты) и т.п., растворимые Т-клеточные рецепторы, интерлейкины, гормоны и факторы роста.

[0068] В контексте настоящей заявки термины “опухоль-нацеленный суперантиген” или “TTS” или “рак-нацеленный суперантиген” означают молекулу, включающую один или несколько суперантигенов, ковалентно связанных (непосредственно или опосредованно) с одним или несколькими нацеливающими фрагментами.

[0069] В контексте настоящей заявки термин “Т-клеточный рецептор” означает рецептор, специфический для Т-клеток, и включает понимание термина, известное в данной области. Этот термин также включает, например, рецептор, который содержит дисульфид-связанный гетеродимер высоковариабельных цепей α или β , экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с инвариантными цепями CD3, и рецептор, состоящий из вариабельных цепей γ и δ , экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с CD3 на субпопуляции Т-клеток.

[0070] В контексте настоящей заявки термины “терапевтически эффективное количество” и “эффективное количество” означают количество активного агента, например, фармацевтически активного средства или фармацевтической композиции, которое оказывает по меньшей мере некоторый эффект при лечении заболевания или состояния. Эффективное количество фармацевтически активного агента(агентов), используемого для осуществления настоящего изобретения для терапевтического лечения, варьируется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов, применений или доз, и не предполагается, что оно ограничивается конкретной композицией или путем введения.

[0071] В контексте настоящей заявки термины “субъект” и “пациент” относятся к организму, подлежащему лечению способами и композициями, описанными в настоящей заявке. Такие организмы предпочтительно включают, но не ограничиваются этим, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, псовых, кошачьих и т.п.) и более предпочтительно включают людей.

[0072] В контексте настоящей заявки термины “лечить”, “лечащий” и “лечение” означают лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека. Это включает: (a) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития; и (b) облегчение заболевания, т.е. регрессию болезненного состояния; и (c) излечение болезни. Как они используются в контексте терапевтического лечения, термины “предотвращать” или “блокировать” понимаются как полностью предотвращающие или блокирующие, или не полностью предотвращающие или блокирующие (например, частично предотвращающие или блокирующие) данный акт, действие, активность или событие.

[0073] В контексте настоящей заявки термин “ингибирует рост рака” означает заметное замедление, остановку или реверсирование скорости роста рака или раковых клеток *in vitro* или *in vivo*. Желательно, когда скорость роста замедляется на 20%, 30%, 50% или 70% или более, как определено с использованием подходящего анализа для определения скорости роста клеток. Как правило, изменение скорости роста достигается

за счет инициирования или ускорения некротических или апоптотических механизмов клеточной гибели в опухолевых клетках, что приводит к уменьшению размера новообразования.

[0074] В контексте настоящей заявки термины “вариант”, “варианты”, “модифицированный”, “измененный”, “мутированный” и т.п., означают белки или пептиды и/или другие агенты и/или соединения, которые отличаются от эталонного белка, пептида или другого соединения. Варианты в этом смысле описаны ниже и в других местах более подробно. Например, изменения в нуклеиновокислотной последовательности варианта могут быть молчащими, например, они могут не изменять аминокислоты, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты. Если изменения ограничены молчащими изменениями этого типа, вариант будет кодировать пептид с той же аминокислотной последовательностью, что и эталонный пептид. Изменения в нуклеиновокислотной последовательности варианта могут изменить аминокислотную последовательность пептида, кодируемого эталонной нуклеиновокислотной последовательностью. Такие нуклеиновокислотные изменения могут привести к аминокислотным заменам, добавлениям, делециям, слияниям и/или усечениям в белке или пептиде, кодируемом эталонной последовательностью, как обсуждается ниже. Как правило, различия в аминокислотных последовательностях ограничены, так что последовательности эталона и варианта в целом сходны и во многих областях идентичны. Вариант и эталонный белок или пептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или несколькими заменами, добавлениями, делециями, слияниями и/или усечениями, которые могут присутствовать в любой комбинации. Вариант также может представлять собой фрагмент белка или пептида по изобретению, который отличается от последовательности эталонного белка или пептида тем, что он короче эталонной последовательности, например, за счет концевой или внутренней делеции. Другой вариант белка или пептида по изобретению также включает белок или пептид, который сохраняет по существу ту же функцию или активность, что и эталонный белок или пептид. Вариант также может представлять собой: (i) вариант, в котором один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком, и такой замененный аминокислотный остаток может кодироваться или не кодироваться генетическим кодом, или (ii) вариант, в котором один или несколько аминокислотных остатков включают замещающую группу, или (iii) вариант, в котором зрелый белок или пептид слит с другим соединением, таким как соединение для увеличения периода полужизни белка или пептида (например, полиэтиленгликоль), или (iv) вариант, в котором дополнительные аминокислоты слиты со зрелым белком или пептидом, например, лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которую используют для очистки зрелого белка или пептида. Варианты могут быть получены с использованием методов мутагенеза и/или механизмов изменения, таких как химические изменения, слияния, дополнения и т.п., включая применяемые для нуклеиновых кислот, аминокислот, клеток или организмов, и/или могут

быть получены рекомбинантными методами.

[0075] В контексте настоящей заявки термин “последовательное введение” и связанная с ним терминология относится к введению по меньшей мере одного агента (например, конъюгата суперантигена) с по меньшей мере одним дополнительным агентом (например, иммунной клеткой) и включает ступенчатые дозы этих агентов (т.е. с разнесением по времени) и вариации величины дозы. Это включает один агент, вводимый до, совместно с (частично или полностью) или после введения другого агента. Кроме того, термин “последовательное введение” и связанная с ним терминология также включает введение по меньшей мере одного суперантигена, одной иммунной клетки и одного или более необязательных дополнительных соединений, таких как, например, кортикостероид, иммуномодулятор и другое средство, предназначенное для снижения потенциальной иммунореактивности в отношении конъюгата суперантигена, вводимого субъекту.

[0076] Используемые в настоящей заявке термины “системный” и “системно” в контексте введения означают введение агента таким образом, что агент контактирует по меньшей мере с одной системой, связанной со всем организмом, такой как, но не ограничиваясь этим, система кровообращения, иммунная система и лимфатическая система, а не только с локализованной частью тела, такой как, но не ограничиваясь этим, внутри опухоли. Таким образом, например, системная терапия или агент, вводимый системно, представляет собой терапию или агент, при использовании которых по меньшей мере одна система, связанная со всем организмом, подвергается воздействию терапии или агента, а не только ткани-мишени.

[0077] В контексте настоящей заявки термин “парентеральное введение” включает любую форму введения, при которой соединение абсорбируется субъектом без вовлечения абсорбции через кишечник. Иллюстративные парентеральные введения, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, внутримышечное, внутривенное, внутривнутрибрюшинное или внутрисуставное введение.

[0078] При использовании термина “около” перед количественным значением, настоящее изобретение также включает само конкретное количественное значение, если специально не указано иное. В контексте настоящей заявки термин “около” относится к отклонению $\pm 10\%$ от номинального значения, если не указано или не предполагается иное.

[0079] В различных местах настоящего описания значения раскрываются в группах или в диапазонах. В частности, предполагают, что описание включает каждую отдельную подкомбинацию членов таких групп и диапазонов. Например, целое число в диапазоне от 0 до 40 специально предназначено для индивидуального раскрытия 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, а целое число в диапазоне от 1 до 20 специально предназначено для индивидуального раскрытия 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

[0080] В настоящем описании, где композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы

описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные стадии, предполагается, что, кроме того, существуют композиции по настоящему изобретению, которые состоят в основном из или состоят из перечисленных компонентов и что существуют процессы и способы согласно настоящему изобретению, которые в основном состоят из или состоят из перечисленных технологических стадий.

[0081] В заявке, где указано, что элемент или компонент включен и/или выбран из перечисленных элементов или компонентов, 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.

[0082] Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описанные в настоящей заявке, могут комбинироваться различными способами без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, которые являются явными или подразумеваемыми. Например, когда делается ссылка на конкретное соединение, это соединение можно использовать в различных вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению и/или в способах по настоящему изобретению, если из контекста не следует иное. Другими словами, в настоящей заявке варианты осуществления были описаны и показаны таким образом, чтобы можно было написать и изложить четкую и краткую заявку, но предполагается и должно быть понятно, что варианты осуществления могут быть по-разному объединены или разделены без отступления от настоящей идеи и изобретения(изобретений). Например, должно быть понятно, что все признаки, описанные и показанные в настоящей заявке, могут быть применимы ко всем описанным и показанным в настоящей заявке аспектам изобретения(изобретений).

[0083] Следует понимать, что выражение “по меньшей мере один из” включает индивидуально каждый из объектов, перечисленных после этого выражения, и различные комбинации двух или более перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и использования. Выражение “и/или” в связи с тремя или более перечисляемыми объектами следует понимать как имеющее то же значение, если иное не следует из контекста.

[0084] Использование термина “включают”, “включает”, “включая”, “имеют”, “имеет”, “имеющий”, “содержат”, “содержит”, или “содержащий”, включая их грамматические эквиваленты, как правило, следует понимать как неограниченный и не ограничивающий, например, не исключающий дополнительные неуказанные элементы или стадии, если иное специально не указано или не следует из контекста.

[0085] Следует понимать, что порядок стадий или порядок осуществления определенных действий не имеет значения при условии, что настоящее изобретение остается работоспособным. Более того, две или более стадий или действий можно осуществлять одновременно.

[0086] Использование в настоящей заявке любых и всех примеров или вводного слова перед примером, например, “такой как” или “включая”, предназначено просто для

лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, за исключением случаев, когда это заявлено. Никакая формулировка в описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения настоящего изобретения.

II. Иммунные клетки

[0087] Среди прочего, настоящее изобретение обеспечивает (i) способы и композиции, включающие иммунную клетку, полезную при лечении рака, где иммунную клетку можно использовать в чистом виде или в комбинации с конъюгатом суперантигена, и (ii) способы получения иммунной клетки, полезной при лечении рака.

[0088] Иммунные клетки включают, например, лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки, натуральные киллерные клетки (НК-клетки), натуральные киллерные Т-клетки (НКТ-клетки), миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты.

[0089] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку, которая может представлять собой, например, культивированную Т-клетку, например, первичную Т-клетку или Т-клетку из культивированной Т-клеточной линии, например, Jurkat, SupT1 и т.д., или Т-клетку, полученную от млекопитающего, например, от субъекта, подлежащего лечению. В случае получения от млекопитающего Т-клетка может быть получена из многочисленных источников, включая, но не ограничиваясь этим, кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Т-клетка может быть любым типом Т-клетки и может находиться на любой стадии развития, включая, но не ограничиваясь этим, CD4⁺/CD8⁺ дважды положительные Т-клетки, CD4⁺ хелперные Т-клетки, например, Th1 и Th2 клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ), Т-клетки памяти (например, Т-клетки центральной памяти и эффекторные Т-клетки памяти), наивные Т-клетки и т.п. Клетки (например, Т-клетки) могут включать аутологичные клетки, полученные от субъекта, подлежащего лечению, или альтернативно аллогенные клетки, полученные от донора.

[0090] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка связывает антиген, например, раковый антиген, через Т-клеточный рецептор. Т-клеточный рецептор может быть эндогенным или рекомбинантным Т-клеточным рецептором. Т-клеточные рецепторы состоят из двух цепей, называемых α - и β -цепями, которые объединяются на поверхности Т-клетки с образованием гетеродимерного рецептора, который может распознавать МНС-ограниченные антигены. Каждая из α - и β -цепей включает две области, константную область и переменную область. Каждая переменная область α - и β -цепей определяет три петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), известными как CDR₁, CDR₂ и CDR₃, которые придают Т-клеточному рецептору антигенсвязывающую активность и специфичность связывания.

[0091] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка включает Т-

клеточный рецептор, включающий В-переменную 7-9 Т-клеточного рецептора (TRBV7-9). Иллюстративная аминокислотная последовательность TRBV7-9 представлена в SEQ ID NO: 11, а иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая TRBV7-9, представлена в SEQ ID NO: 12. Термин TRBV7-9 включает варианты, имеющие одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок относительно последовательности TRBV7-9 дикого типа, и/или слитые белки или конъюгаты, включающие TRBV7-9. В контексте настоящей заявки термин “функциональный фрагмент” TRBV7-9 относится к фрагменту полноразмерного TRBV7-9, который сохраняет, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% SEA/E-120 связывающей активности соответствующего полноразмерного природного TRBV7-9.

[0092] Предполагают, что в фармацевтической композиции, включающей иммунные клетки, например, Т-клетки, включающие Т-клеточный рецептор, включающий β-переменную 7-9 Т-клеточного рецептора (TRBV7-9), по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% клеток могут включать Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9. Например, в некоторых вариантах осуществления от около 2% до около 100%, от около 5% до около 100%, от около 10% до около 100%, от около 20% до около 100%, от около 30% до около 100%, от около 40% до около 100%, от около 60% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 2% до около 80%, от около 5% до около 80%, от около 10% до около 80%, от около 20% до около 80%, от около 30% до около 80%, от около 40% до около 80%, от около 60% до около 80%, от около 2% до около 60%, от около 5% до около 60%, от около 10% до около 60%, от около 20% до около 60%, от около 30% до около 60%, от около 40% до около 60%, от около 2% до около 40%, от около 5% до около 40%, от около 10% до около 40%, от около 20% до около 40%, от около 30% до около 40%, от около 2% до около 30%, от около 5% до около 30%, от около 10% до около 30%, от около 20% до около 30%, от около 2% до около 20%, от около 5% до около 20%, от около 10% до около 20%, от около 2% до около 10%, от около 5% до около 10% или от около 2% до около 5% клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

[0093] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, например, Т-клетка или NKT-клетка, связывается с антигеном, например, раковым антигеном, через химерный антигенный рецептор (CAR), т.е. Т-клетка или NKT-клетка включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. В контексте настоящей заявки термины “химерный антигенный рецептор” или “CAR” относятся к любому искусственному рецептору, включающему антигенспецифический связывающий фрагмент и одну или несколько сигнальных цепей, полученных из иммунного рецептора.

CAR могут включать одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела, специфического в отношении антигена, связанного через шарнирную и трансмембранную области с цитоплазматическими доменами Т-клеточных сигнальных молекул (например, Т-клеточный костимулирующий домен (например, из CD28, CD137, OX40, ICOS или CD27) в тандеме с триггерным доменом Т-клеток (например, из CD3ζ)) и/или с цитоплазматическими доменами NK-клеточных сигнальных молекул (например, ДНК-активирующий белок 12 (DAP12)). Т-клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, называется CAR Т-клеткой, NK-клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, называется CAR NK-клеткой, а NKT-клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, называется CAR NKT-клеткой.

[0094] Иллюстративные CAR Т-клетки включают CD19-нацеленные CTL019 клетки (Novartis; см., Grupp et al. (2015) *Blood* 126:4983), JCAR014 (Juno Therapeutics), клетки JCAR015/19-28z (Juno Therapeutics; см., Park et al. (2015) *J. Clin. Oncol.* 33(15S):7010), клетки JCAR017 (Juno Therapeutics), клетки KTE-C19 (Kite Pharma; см., Locke et al. (2015) *Blood* 126:3991) и клетки UCART19 (Cellestis; см., Gouble et al. (2014) *Blood* 124:4689). Дополнительные иллюстративные CD19-нацеленные CAR или CD19-нацеленные CAR Т-клетки описаны в патенте США № 7446179, 8399645, патентных заявках США №№ US20130071414, US20140370045, US20140271635, US20170166623, US20150283178 и US20170107286, международных (PCT) публикациях №№ WO2009091826, WO2012079000, WO2014153270, WO2014184143, WO2015095895, WO2016210293, WO2016139487 и WO2016100232, а также в Makita et al. (2017) *CANCER SCIENCE* 108(6):1109-1118, Brentjens et al. (2011) *Blood* 118(18):4817, Davila et al. (2014) *Sci. Transl. Med.* 6(224):224, Lee et al. (2015) *Lancet* 385(9967):517, Brentjens et al. (2013) *Sci. Transl. Med.* 5(177):177, Grupp et al. (2013) *N. Engl. J. Med.* 368(16):1509, Porter et al. (2011) *N. Engl. J. Med.* 365(8):725, Kochenderfer et al. (2013) *Blood*, and Kalos et al. (2011) *Sci. Transl. Med.* 3(95):95. Иллюстративные CAR Т-клетки, нацеленные на мезотелин, описаны в Международных (PCT) публикациях №№ WO2013142034, WO2015188141 и WO2017040945. Дополнительные иллюстративные CAR или CAR Т-клетки описаны в патентах США №№ 5712149, 5906936, 5843728, 6083751, 6319494, 7446190, 7741965, 8399645, 8906682, 9181527, 9272002 и 9266960, патентных заявках США №№ US20160362472, US20160200824 и US20160311917 и международной (PCT) публикации № WO2015120180. Сконструированные иммунные клетки, содержащие нокаут Т-клеточного рецептора и химерный антигенный рецептор, который связывает CD123, описаны в международной (PCT) публикации № WO2016120220.

[0095] CAR Т-клетки могут быть получены с использованием способов, известных в данной области. Т-клетки можно получить из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки, опухоли и Т-клеточные линии. Например, Т-клетки можно получить из порции крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества

способов, известных специалистам в данной области, таких как разделение Ficoll™. В некоторых вариантах осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Клетки, собранные методом афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и поместить клетки в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. Например, клетки можно промывать фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca²⁺ или Mg²⁺ PBS, PlasmaLyte A или другие солевые растворы и/или буферные растворы. Т-клетки также можно выделить из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или путем центрифужной элютриации в противотоке. Специфическая субпопуляция Т-клеток, такая как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, может быть также выделена методами положительной или отрицательной селекции. Например, в одном варианте осуществления Т-клетки выделяют путем инкубации с гранулами, конъюгированными с анти-CD3/анти-CD28, такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific), в течение периода времени, достаточного для положительного отбора желаемых Т-клеток.

[0096] Т-клетки могут быть сконструированы для экспрессии CAR способами, известными в данной области. Как правило, конструируют полинуклеотидный вектор, который кодирует CAR, и этот вектор трансфицируют или трансдуцируют в популяцию Т-клеток. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, может быть доставлена в клетки с использованием ретровирусного или лентивирусного вектора. Типичный ретровирусный вектор включает, но не ограничивается этим, векторную основу pMSGV1-CD8-28BBZ, полученную из pMSGV (splice-gag вектор на основе вируса мышинных стволовых клеток). Другие примеры лентивирусных векторов см., например, в Dull et al., (1998) J. Virol 72:8463-8471 и патентах США №№ 5994136, 6682907, 7629153, 8329462, 8748169, 9101584. Ретровирусную трансдукцию можно осуществить с использованием известных методов, таких как метод Johnson et al. (Blood 114, 535-546 (2009)). Поверхностную экспрессию CAR на трансдуцированных Т-клетках можно определить, например, методом проточной цитометрии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, также может быть доставлена в клетки с использованием мРНК, транскрибированной *in vitro*.

[0097] Т-клетки и/или Т-клетки, сконструированные для экспрессии CAR, могут быть активированы и размножены, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и публикации патентной заявки США № 20060121005. Как правило, Т-клетки размножаются при контакте с агентом, который стимулирует CD3/TCR

комплекс=ассоциированный сигнал, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. Например, популяции Т-клеток можно стимулировать путем контакта с анти-CD3 антителом, анти-CD28 антителом, анти-CD2 антителом или активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) и/или ионофором кальция.

[0098] Другие способы получения CAR Т-клеток описаны, например, в Levine et al. (2016) MOL. THER. METHODS CLIN. DEV. 4:92-101.

[0099] В некоторых вариантах осуществления CAR связывает раковый антиген, выбранный из 5T4, мезотелина, простатспецифического мембранного антигена (PSMA), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), карбоангидразы IX (CAIX), карцино-эмбрионального антигена (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD47, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиального гликопротеина 2 (EGP 2), эпителиального гликопротеина-40 (EGP-40), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), фолат-связывающего белка (FBP), фетального ацетилхолинового рецептора (AChR), фолатного рецептора- α и β (FR α и β), ганглиозида G2 (GD2), ганглиозида G3 (GD3), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER-2/ERB2), рецептора эпидермального фактора роста ν III (EGFR ν III), ERB3, ERB4, обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), альфа-2 субъединицы рецептора интерлейкина 13 (IL-13Ra2), К-легкой цепи, рецептора домена вставки киназы (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), молекулы клеточной адгезии L1 (L1CAM), ассоциированного с меланомой антигена 1 (семейство меланомных антигенов A1, MAGE-A1), муцина 16 (MUC-16), муцина 1 (MUC-1), лигандов KG2D, раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1, опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), фактора роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белка опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранной рецепторной протеинтирозинкиназы 1 типа (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфат протеогликана-4 (CSPG4), вспомогательной молекулы DNAX (DNAM-1), рецептора 2 эфрина типа А (EphA2), ассоциированного с фибробластами белка (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикана 3 (GPC3), HA-III, HERK-V, IL-1 IRa, латентного мембранного белка 1 (LMP1), молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56), лиганда 1 рецептора запрограммированной гибели клеток (PD-L1), В-клеточного антигена созревания (BCMA) и Trail-рецептора (TRAIL R).

III. Конъюгат суперантигена

A. Суперантигены

[00100] Суперантигены представляют собой бактериальные белки, вирусные белки и белки, сконструированные человеком, способные активировать Т-лимфоциты, например, в пикомолярных концентрациях. Суперантигены также могут активировать большое количество Т-лимфоцитов (Т-клеток). Суперантигены могут связываться с главным комплексом гистосовместимости I (MHC I) не будучи процессированными, и, в частности, могут связываться с консервативными областями за пределами

антигенсвязывающей бороздки на молекулах МНС класса II (например, на моноцитах), избегая большей части полиморфизма в обычном пептид-связывающем сайте. 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, но не ограничиваются этим, стафилококковый энтеротоксин (SE), стрептококковый пиогенный экзотоксин (SPE), токсин синдрома токсического шока *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин А (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE).

[00101] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие многие суперантигены, были выделены и клонированы, а суперантигены, экспрессированные из этих или модифицированных (реконструированных) полинуклеотидных последовательностей, использовались в противораковой терапии (см. наптумомаб эстафенатокс/ANYARA®, обсуждаемый ниже). Суперантигены, экспрессируемые этими полинуклеотидными последовательностями, могут представлять собой суперантигены дикого типа, модифицированные суперантигены или суперантигены дикого типа или модифицированные суперантигены, конъюгированные или слитые с нацеливающими фрагментами. Суперантигены можно вводить млекопитающему, такому как человек, непосредственно, например, путем инъекции, или можно доставить, например, путем воздействия суперантигена на кровь пациента вне организма, или, например, путем доставки гена, кодирующего суперантиген, в организм млекопитающего, подлежащего лечению (например, при помощи известных методов генной терапии и векторов, например, при помощи клеток, содержащих и способных экспрессировать ген) и экспрессии гена в организме млекопитающего.

[00102] Примеры суперантигенов и их введения млекопитающим описаны в следующих патентах и патентных заявках США: патенты США №№ 5858363, 6197299, 6514498, 6713284, 6692746, 6632640, 6632441, 6447777, 6399332, 6340461, 6338845, 6251385, 6221351, 6180097, 6126945, 6042837, 6713284, 6632640, 6632441, 5859207, 5728388, 5545716, 5519114, 6926694, 7125554, 7226595, 7226601, 7094603, 7087235, 6835818, 7198398, 6774218, 6913755, 6969616 и 6713284, патентные заявки США №№ 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190 и 2002/0051765 и публикация международной заявки РСТ номер WO/03/094846.

В. Модифицированные суперантигены

[00103] В рамках настоящего изобретения суперантигены могут быть сконструированы различными способами, включая модификации, которые сохраняют или усиливают способность суперантигена стимулировать Т-лимфоциты и могут, например, изменять другие аспекты суперантигена, такие как, например, его серореактивность или иммуногенность. Модифицированные суперантигены включают синтетические молекулы, обладающие суперантигенной активностью (т.е. способностью активировать

субпопуляции Т-лимфоцитов).

[00104] 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, что приводит к цитотоксичности опухолевых клеток. Кроме того, аффинность суперантигена к молекуле МНС класса II может быть снижена с минимальным влиянием на цитотоксичность суперантигена. Это, например, может помочь уменьшить токсичность, которая в противном случае может возникнуть, если суперантиген сохраняет свою способность дикого типа связывать антигены МНС класса II (как в таком случае ответом на суперантиген также могут быть затронуты клетки, экспрессирующие класс II, такие как клетки иммунной системы).

[00105] Методы модификации суперантигенов (например, полинуклеотидов и полипептидов), включая получение синтетических суперантигенов, хорошо известны в данной области и включают, например, ПЦР-мутагенез, аланин-сканирующий мутагенез и сайт-специфический мутагенез (см. патенты США №№ 5220007; 5284760; 5354670; 5366878; 5389514; 5635377; и 5789166).

[00106] В некоторых вариантах осуществления суперантиген может быть модифицирован таким образом, что его серореактивность снижается по сравнению с эталонным суперантигеном дикого типа, но его способность активировать Т-клетки сохраняется или усиливается по сравнению с суперантигеном дикого типа. Один из методов получения таких модифицированных суперантигенов включает замену определенных аминокислот в определенных областях одного суперантигена на другой. Это возможно, потому что многие суперантигены, включая, но не ограничиваясь этим, SEA, SEE и SED, имеют гомологию последовательностей в определенных областях, которые связывают с определенными функциями (Marrack and Kappler (1990) Science 248(4959): 1066; см. также Фиг. 1, которая показывает область гомологии между различными суперантигенами дикого типа и сконструированными). Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суперантиген, который имеет желательный индуцирующий активацию Т-клеток ответ, но нежелательную высокую серореактивность, модифицируют таким образом, что полученный суперантиген сохраняет свою способность к активации Т-клеток, но имеет пониженную серореактивность.

[00107] Специалистам в данной области известно и понятно, что сыворотка человека обычно содержит различные титры антител против суперантигенов. Например, для стафилококковых суперантигенов относительные титры представляют собой 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). На основании 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 В). Однако, как также было обнаружено, разные суперантигены обладают различными свойствами активации Т-клеток по сравнению друг с другом, и, что касается суперантигенов дикого типа, лучшие суперантигены, активирующие Т-клетки, часто также обладают нежелательно высокой серореактивностью.

[00108] Эти относительные титры иногда соответствуют потенциальным проблемам с серореактивностью, например, проблемам с нейтрализующими антителами. Таким образом, использование суперантигена с низким титром, такого как SEA или SEE, может быть полезным для снижения или предотвращения серореактивности парентерально вводимых суперантигенов. Суперантиген с низким титром имеет низкую серореактивность, измеряемую, например, при помощи типичных антител против суперантигена в общей популяции. В некоторых случаях он может также иметь низкую иммуногенность. Такие суперантигены с низким титром могут быть модифицированы для сохранения их низкого титра, как описано в настоящей заявке.

[00109] Подходы к модификации суперантигенов можно использовать для создания суперантигенов, обладающих как желаемыми свойствами активации Т-клеток, так и пониженной серореактивностью, а в некоторых случаях также пониженной иммуногенностью. Учитывая, что определенные области гомологии между суперантигенами связаны с серореактивностью, можно сконструировать рекомбинантный суперантиген, который имеет желаемую активацию Т-клеток и желаемую серореактивность и/или иммуногенность. Кроме того, белковые последовательности и иммунологическая перекрестная реактивность суперантигенов или стафилококковых энтеротоксинов разделены на две родственные группы. Одна группа состоит из SEA, SEE и SED. Вторая группа представляет собой SPEA, SEC и SEB. Таким образом, можно подобрать суперантигены с низким титром для снижения или устранения перекрестной реактивности с имеющими высокий титр или эндогенными антителами, направленными против стафилококковых энтеротоксинов.

[00110] Области в суперантигенах, которые, как считают, играют роль в серореактивности, 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 Е, которая включает аминокислотные остатки 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226 и 227 (см. патент США № 7125554 и **Фиг. 1** в настоящей заявке). Таким образом, предполагают, что эти области могут быть мутированы с использованием, например, аминокислотной замены, для получения суперантигена с измененной серореактивностью.

[00111] Полипептидные или аминокислотные последовательности для вышеперечисленных суперантигенов можно получить из любого банка данных последовательностей, например, Protein Data Bank и/или GenBank. Иллюстративные номера доступа GenBank включают, но не ограничиваются этим, SEE - P12993; SEA -

P013163; SEB - P01552; SEC1 - P01553; SED - P20723; и SEN - AAA19777.

[00112] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2) можно модифицировать таким образом, чтобы аминокислоты в любой из идентифицированных областей А-Е (см., **Фиг. 1**) были заменены другими аминокислотами. Такие замены включают, например, К79, К81, К83 и D227, или К79, К81, К83, К84 и D227, или, например, К79Е, К81Е, К83S и D227S, или К79Е, К81Е, К83S, К84S и D227А. В некоторых вариантах осуществления суперантиген представляет собой SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3; см. также патент США № 7125554) или SEA_{D227A} (SEQ ID NO: 4; см. также патент США № 7226601).

1. Модифицированные полинуклеотиды и полипептиды

[00113] Биологический функциональный эквивалент полинуклеотида, кодирующего природный или эталонный суперантиген, может включать полинуклеотид, который был сконструирован так, чтобы содержать разные последовательности, сохраняя в то же время способность кодировать встречающийся природный или эталонный суперантиген. Этого можно добиться за счет вырожденности генетического кода, т.е. присутствия множества кодонов, кодирующих одни и те же аминокислоты. В одном примере можно ввести в полинуклеотид последовательность распознавания рестрикционного фермента, не нарушая при этом способности этого полинуклеотида кодировать белок. Другие полинуклеотидные последовательности могут кодировать суперантигены, которые отличаются друг от друга, но функционально практически эквивалентны по меньшей мере в одном биологическом свойстве или активности (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% биологического свойства или активности, например, без ограничений, способность индуцировать Т-клеточный ответ, который приводит к в цитотоксичности опухолевых клеток) эталонному суперантигену.

[00114] В другом примере полинуклеотид может представлять собой (и кодировать) суперантиген, функционально эквивалентный эталонному суперантигену, даже если он может содержать более значительные изменения. Некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в белковой структуре без заметной потери способности к интерактивному связыванию со структурами, такими как, например, антигенсвязывающие области антител, сайты связывания на молекулах субстрата, рецепторы и т.п. Кроме того, консервативные аминокислотные замены могут не нарушать биологическую активность белка, поскольку полученные структурные изменения часто не влияют на способность белка выполнять предназначенную ему функцию. Таким образом, предполагается, что различные изменения могут быть сделаны в последовательности генов и белков, раскрытых в настоящей заявке, с достижением при этом целей настоящего изобретения.

[00115] Аминокислотные замены могут быть сконструированы так, чтобы использовать относительное сходство заместителей боковой цепи аминокислоты,

например, их гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и/или т.п. Анализ размера, формы и/или типа заместителей боковых цепей аминокислот показывает, что аргинин, лизин и/или гистидин все являются положительно заряженными остатками; что аланин, глицин и/или серин все имеют одинаковый размер; и/или что фенилаланин, триптофан и/или тирозин все имеют в целом одинаковую форму. Следовательно, исходя из этих соображений, аргинин, лизин и/или гистидин; аланин, глицин и/или серин; и/или фенилаланин, триптофан и/или тирозин определены в настоящей заявке как биологически функциональные эквиваленты. Кроме того, возможно введение не встречающихся в природе аминокислот. Подходы к замене аминокислот другими природными и не природными аминокислотами описаны в патенте США № 7763253.

[00116] Что касается функциональных эквивалентов, то подразумевается, что в определении “биологически функциональный эквивалент” белка и/или полинуклеотида, существует концепция ограниченного числа изменений, которые могут быть сделаны в определенной части молекулы при сохранении молекулы с приемлемым уровнем эквивалентной биологической активности. Таким образом, биологически функциональными эквивалентами считают те 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, что приводит к цитотоксичности опухолевых клеток.

[00117] Кроме того, следует иметь в виду, что модифицированный суперантиген может быть создан путем замены гомологичных областей различных белков посредством “обмена доменами”, что подразумевает создание химерных молекул с использованием различных, но в данном случае родственных полипептидов. Путем сравнения различных суперантигенных белков для идентификации функционально связанных областей этих молекул (см., например, **Фиг. 1**), можно поменять местами родственные домены этих молекул, чтобы определить критичность этих областей для суперантигенной функции. Эти молекулы могут иметь дополнительную ценность, поскольку эти “химеры” можно отличить от природных молекул, хотя, возможно, они обеспечивают ту же функцию.

[00118] В некоторых вариантах осуществления суперантиген включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности эталонного суперантигена, выбранного 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 свойства эталонного суперантигена.

[00119] 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 свойства

эталонного суперантигена.

[00120] Идентичность последовательности можно определить различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (средство поиска основного локального выравнивания) с использованием алгоритма, примененного 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, включены посредством ссылки), предназначен для поиска сходства последовательностей. Обсуждение основных вопросов поиска в базах данных последовательностей см. в Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6:119-129, который включен посредством ссылки в полном объеме. Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описаний, выравнивания, ожидания (т.е. порог статистической значимости для сообщаемых совпадений с последовательностями базы данных), отсечки, матрицы и фильтра имеют настройки по умолчанию. Матрица оценки по умолчанию, используемая blastp, blastx, tblastn и tblastx, представляет собой матрицу BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, включен посредством ссылки в полном объеме). Четыре параметра blastn можно настроить следующим образом: Q=10 (штраф за создание гэпа); R=10 (штраф за удлинение гэпа); wink=1 (генерирует совпадения слов в каждом положении в запросе wink.sup.th); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, в пределах которого генерируются выравнивания с гэпами). Эквивалентными настройками параметра Blastp могут быть Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Поиск также можно осуществить с использованием параметра NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) BLAST Advanced Option (например: -G, штраф за открытие гэпа [Целое число]: по умолчанию=5 для нуклеотидов/ 11 для белков; -E, штраф за удлинение гэпа [Целое число]: по умолчанию=2 для нуклеотидов/ 1 для белков; -q, Штраф за несовпадение нуклеотидов [Целое число]: по умолчанию=-3; -r, вознаграждение за совпадение нуклеотидов [Целое число]: по умолчанию=1; -e, ожидаемое значение [реальное]: по умолчанию=10; -W, размер слова [Целое число]: по умолчанию=11 для нуклеотидов/ 28 для мегабласта/3 для белков; -y, Возврат (X) за расширение blast в битах: по умолчанию=20 за blastn/ 7 за другие; -X, значение возврата X для выравнивания с гэпами (в битах): по умолчанию=15 для всех программ, не применимо к blastn; и -Z, конечное значение возврата X для выравнивания с гэпами (в битах): 50 для blastn, 25 для других). Также можно использовать ClustalW для парного выравнивания белков (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosum62 и штраф за открытие гэпа=10 и штраф за удлинение гэпа=0,1). Программа сравнения последовательностей Bestfit, доступная в пакете GCG версии 10.0, использует параметры

ДНК GAP=50 (штраф за создание гэпа) и LEN=3 (штраф за удлинение гэпа), и эквивалентные настройки сравнения белков - GAP=8 и LEN=2.

С. Нацеленные суперантигены

[00121] Для повышения специфичности суперантиген предпочтительно конъюгируют с нацеливающим фрагментом для создания нацеленного конъюгата суперантигена, который связывает антиген, предпочтительно экспрессируемый раковой клеткой, например, антиген клеточной поверхности, такой как 5T4. Нацеливающий фрагмент представляет собой носитель, который можно использовать для связывания суперантигена с раковыми клетками, например, с поверхностью раковых клеток. Нацеленный конъюгат суперантигена должен сохранять способность активировать большое количество Т-лимфоцитов. Например, нацеленный конъюгат суперантигена должен активировать большое количество Т-клеток и направлять их к тканям, содержащим опухоль-ассоциированный антиген, связанный с нацеливающим фрагментом. В таких ситуациях преимущественно погибают определенные клетки-мишени, оставляя остальную часть тела относительно невредимой. Этот тип терапии желателен, поскольку неспецифические противораковые средства, такие как цитостатические химиотерапевтические средства, являются неспецифическими и убивают большое количество клеток, не связанных с подлежащими лечению опухолями. Например, исследования с нацеленными конъюгатами суперантигенов показали, что воспаление с инфильтрацией цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) в опухолевую ткань быстро усиливается в ответ на первую инъекцию нацеленного 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 действия нацеленных суперантигенов.

[00122] Нацеленные на опухоль суперантигены представляют собой иммунотерапию против рака и являются терапевтическими слитыми белками, содержащими нацеливающий 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).

[00123] Нацеливающий фрагмент, в принципе, может быть любой структурой, которая способна связываться с клеточной молекулой, например, молекулой клеточной поверхности, и предпочтительно представляет собой молекулу, специфическую для заболевания. Молекула-мишень (например, антиген), против которой направлен нацеливающий фрагмент, обычно отличается от (а) эпитопа цепи V β , с которым связывается суперантиген, и (б) эпитопов МНС класса II, с которыми связываются суперантигены. Нацеливающий фрагмент может быть выбран из антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, растворимых Т-клеточных рецепторов, факторов роста, интерлейкинов (например, интерлейкин-2), гормонов и т.д.

[00124] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело (например, Fab, F(ab)₂, Fv, одноцепочечное

антитело и т.д.). Антитела являются чрезвычайно универсальными и полезными клеточно-специфическими нацеливающими фрагментами, поскольку они обычно могут быть получены против любого представляющего интерес антигена клеточной поверхности. Моноклональные антитела были получены против рецепторов клеточной поверхности, опухолеассоциированных антигенов и маркеров, специфических для линии лейкоцитов, таких как CD антигены. Гены переменных областей антител можно легко выделить из гибридомных клеток способами, хорошо известными в данной области. Примеры опухоли-ассоциированных антигенов, которые можно использовать для получения нацеливающего фрагмента, могут включать, но не ограничиваются этим, gp100, Melan-A/MART, MAGE-A, MAGE (антиген E меланомы), MAGE-3, MAGE-4, MAGEA3, тирозиназу, TRP2, NY-ESO-1, CEA (карцино-эмбриональный антиген), PSA, p53, маммаглобин-A, сурвивин, MUC1 (муцин1)/DF3, металлопнстимулин-1 (MPS-1), изоформу 1B1 цитохрома P450, 90K/Mac-2 связывающий белок, Ep-CAM (MK-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, LAGE-1/CAMEL, TAGE-1, GAGE, 5T4, gp70, SCP-1, c-мус, циклин B1, MDM2, p62, Koc, IMP1, RCAS1, TA90, OA1, CT-7, HOM-MEL-40/SSX-2, SSX-1, SSX-4, HOM-TE5-14/SCP-1, HOM-TE5-85, 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, PSMA, TGF β RDN, LMP1, GPC3, Fra, MG7, CD133, CMET, PSCA, глипикан3, ROR1, NKR-2, CD70 и LMNA.

[00125] Иллюстративные антитела против рака могут включать, но не ограничиваются этим, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-5T4 антитела, анти-Ep-CAM антитела, анти-Her-2/neu антитела, анти-EGFR антитела, анти-CEA антитела, антитела против простатспецифического мембранного антигена (PSMA) и анти-IGF-1R антитела. Понятно, что суперантиген может быть конъюгирован с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см., WO8907947) или C242Fab (см., WO9301303).

[00126] Примеры нацеленных на опухоль суперантигенов, которые можно использовать 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. **Фиг. 2** и **Фиг. 3**).

[00127] В предпочтительном варианте осуществления предпочтительный конъюгат представляет собой конъюгат суперантигена, известный как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®], который представляет собой слитый белок Fab фрагмента анти-5T4 антитела и суперантигена SEA/E-120. Наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®] включает две белковые цепи, которые в совокупности включают сконструированный суперантиген стафилококкового энтеротоксина (SEA/E-120) и нацеливающий 5T4 Fab, включающий модифицированные последовательности переменной области 5T4, слитые с последовательностями константной области мышинового антитела IgG1/к C242. Первая белковая цепь включает остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 (см. также, SEQ ID NO: 8) и включает тяжелую цепь химерного 5T4 Fab, соответствующую остаткам 1-222 SEQ ID NO: 7, и суперантиген SEA/E-120, соответствующий остаткам 226-458 SEQ ID NO: 7,

ковалентно связанные через трипептидный линкер, 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 5T4 Fab. Две белковые цепи удерживаются вместе за счет нековалентных взаимодействий между тяжелой и легкой цепями Fab. Остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 соответствуют остаткам 1-458 SEQ ID NO: 8, а 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 за счет нековалентных взаимодействий между тяжелой и легкой цепями Fab. Наптумомаб эстафенатокс/ANYARA[®] индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток в концентрациях около 10 пМ, а суперантигенный компонент конъюгата был разработан так, чтобы иметь низкое связывание с человеческими антителами и МНС класса II.

[00128] Следует иметь в виду, что другие нацеливающие фрагменты на основе антител могут быть сконструированы, модифицированы, экспрессированы и очищены с использованием методов, известных в данной области и более подробно обсуждаемых ниже.

[00129] Другой тип нацеливающего фрагмента включает растворимый Т-клеточный рецептор (TCR). Некоторые формы растворимых TCR 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 делетированы и/или изменены таким образом, что TCR не является связанным с мембраной, как описано в публикациях заявок США U.S. 2002/119149, U.S. 2002/0142389, U.S. 2003/0144474 и U.S. 2003/0175212 и международных публикациях WO2003020763; WO9960120 и WO9960119.

[00130] Нацеливающий фрагмент может быть конъюгирован с суперантигеном с использованием либо рекомбинантных методов, либо путем химического связывания нацеливающего фрагмента с суперантигеном.

1. Рекомбинантный линкер (слитый белок)

[00131] Предполагают, что ген, кодирующий суперантиген, связанный непосредственно или опосредованно (например, через содержащий аминокислоту линкер) с нацеливающим фрагментом, может быть создан и экспрессирован с использованием обычных технологий рекомбинантной ДНК. Например, амино-конец модифицированного суперантигена может быть связан с карбокси-концом нацеливающего фрагмента или наоборот. Что касается антител или фрагментов антител, которые могут служить нацеливающими фрагментами, для создания слитого белка можно использовать либо легкую, либо тяжелую цепь. Например, для Fab-фрагмента, амино-конец модифицированного суперантигена может быть связан с первым константным доменом тяжелой цепи антитела (CH₁). В некоторых случаях модифицированный суперантиген можно связать с Fab-фрагментом путем связывания VH и VL домена с суперантигеном. Альтернативно, можно использовать пептидный линкер для соединения суперантигена и

нацеливающего фрагмента вместе. Когда используют линкер, 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 из 3-7 аминокислотных остатков. Иллюстративный линкер представляет собой трипептид - GlyGlyPro -. Эти подходы были успешно использованы при разработке и изготовлении конъюгата суперантигена наптумомаб эстафенатокс/ANYARA®.

2. Химическая связь

[00132] Также предполагают, что суперантиген может быть связан с нацеливающим фрагментом посредством химической связи. Для химической связи суперантигена с нацеливающим фрагментом может потребоваться линкер, например, пептидный линкер. Пептидный линкер предпочтительно является гидрофильным и содержит один или несколько реакционноспособных фрагментов, выбранных из амидов, простых тиоэфиров, дисульфидов и т.д. (см., патенты США №№ 5858363, 6197299 и 6514498). Также предполагают, что для химической связи можно использовать гомо- или гетеробифункциональные сшивающие реагенты. Химическое связывание суперантигена с нацеливающим фрагментом часто использует функциональные группы (например, первичные аминогруппы или карбоксигруппы), которые присутствуют во многих положениях в соединениях.

IV. Способы экспрессии

[00133] Представляющий интерес белок, например, конъюгат суперантигена, химерный антигенный рецептор и/или субъединица T-клеточного рецептора, может быть экспрессирован в представляющей интерес клетке-хозяине путем включения гена, кодирующего представляющий интерес белок, в соответствующий вектор экспрессии.

[00134] Клетки-хозяева могут быть генетически сконструированы, например, методами трансформации или трансфекции, для включения последовательностей нуклеиновых кислот и экспрессии суперантигена. Введение последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-хозяина можно осуществить путем трансфекции кальций-фосфатным методом, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции, микроинъекции, опосредованной катионным липидом трансфекции, электропорации, трансдукции, введения при соскабливании, баллистического введения, инфицирования или другими способами. Такие способы 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.

[00135] Репрезентативные примеры подходящих клеток-хозяев включают бактериальные клетки, такие как стрептококки, стафилококки, клетки E.coli, Streptomyces и Bacillus subtilis; клетки грибов, такие как клетки дрожжей и клетки аспергилл; клетки насекомых, такие как клетки Drosophila S2 и Spodoptera Sf9; клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, ВНК, HEK-293, и клетки меланомы Bowes.

[00136] При использовании технологий рекомбинантной ДНК интересующий белок может быть экспрессирован с использованием стандартных векторов экспрессии и систем экспрессии. Векторы экспрессии, которые были генетически сконструированы таким образом, 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).

[00137] В контексте настоящей заявки "вектор экспрессии" относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, включающий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии включает достаточное количество cis-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах), ретротранспозоны (например, piggyback и sleeping beauty) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают представляющий интерес рекомбинантный полинуклеотид.

[00138] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. Термин "вирус", используемый в настоящей заявке, используется для обозначения облигатного внутриклеточного паразита, не имеющего механизма синтеза белка или генерирования энергии. Иллюстративные вирусные векторы включают ретровирусные векторы (например, лентивирусные векторы), аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, герпесвирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр (EBV), векторы на основе полиомавируса (например, векторы на основе вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40)), поксвирусные векторы и псевдотипичные вирусные векторы.

[00139] Вирус может быть РНК-вирусом (имеющим геном, состоящий из РНК) или ДНК-вирусом (имеющим геном, состоящий из ДНК). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ДНК-вирусный вектор. Примеры ДНК-вирусов включают парвовирусы (например, аденоассоциированные вирусы), аденовирусы, асфарвирусы, герпесвирусы (например, вирус простого герпеса 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2), вирус Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV)), папилломовирусы (например, HPV), полиомавирусы (например, вакуолизирующий вирус обезьян 40 (SV40)) и поксвирусы (например, вирус осповакцины, вирус коровьей оспы, вирус оспы, вирус оспы птиц, вирус оспы овец, вирус миксомы). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой РНК-вирусный вектор. Примеры РНК-вирусов включают буньявирусы (например, хантавирусы), коронавирусы, флавивирусы (например, вирус желтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус Денге), вирусы гепатита (например, вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита Е), вирусы гриппа

(например, вирус гриппа типа А, вирус гриппа типа В, вирус гриппа типа С), вирус кори, вирус эпидемического паротита, норовирусы (например, вирус Норуолк), полиовирус, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), ретровирусы (например, вирус иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1)) и торовирусы.

[00140] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии включает регуляторную последовательность или промотор, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий белок, например, конъюгат суперантигена, химерный антигенный рецептор и/или субъединицу Т-клеточного рецептора. Термин "функционально связанный" относится к связыванию элементов полинуклеота в функциональной взаимосвязи. Последовательность нуклеиновой кислоты является "функционально связанной", когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с геном, если он влияет на транскрипцию гена. Функционально связанные нуклеотидные последовательности обычно являются непрерывными. Однако, поскольку энхансеры обычно функционируют, когда они отделены от промотора несколькими тысячами пар нуклеотидов, и интронные последовательности могут иметь переменную длину, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть функционально связаны, но не фланкированы непосредственно, и могут даже функционировать в транс-положении от другого аллеля или хромосомы.

[00141] Иллюстративные промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусный LTR, SV40 промотор, промотор цитомегаловируса (CMV) человека, U6 промотор или любой другой промотор (например, клеточные промоторы, такие как эукариотические клеточные промоторы, включая, но не ограничиваясь этим, гистоновые, рол III и β -актиновые промоторы). Другие вирусные промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются этим, аденовирусные промоторы, ТК промоторы и парвовирусные В19 промоторы.

[00142] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор. Использование индуцибельного промотора позволяет включать или выключать экспрессию функционально связанной полинуклеотидной последовательности, когда это необходимо. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируется в присутствии экзогенной молекулы или активности, например, промотора металлотионина, промотора глюкокортикоида, промотора прогестерона и промотора тетрациклина. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируется в микроокружении опухоли, например, IL-2 промотор, NFAT промотор, промотор белка клеточной поверхности (например, CD69 промотор или PD-1 промотор), промотор цитокина (например, TNF промотор), промотор клеточной активации (например, CTLA4, OX40 или CD40L промотор) или промотор белка адгезии клеточной поверхности (например, VLA-1 промотор).

[00143] В некоторых вариантах осуществления промотор опосредует быструю устойчивую экспрессию, измеряемую в днях (например, CD69 промотор). В некоторых

вариантах осуществления промотор опосредует отсроченную, поздно индуцируемую экспрессию (например, VLA1 промотор). В некоторых вариантах осуществления промотор опосредует быструю транзистентную экспрессию (например, TNF промотор, промотор гена немедленно раннего ответа и другие).

[00144] Выбор промотора, например, сильного, слабого, индуцибельного, тканеспецифического, специфического для развития, имеющего специфическую кинетику активации (например, раннюю и/или позднюю активацию) и/или имеющего специфическую кинетику экспрессии индуцированного гена (например, короткую или длительную экспрессию) находится в пределах обычной квалификации специалиста в данной области техники и будет очевидным для специалистов в данной области техники на основании указаний, содержащихся в в настоящей заявке.

[00145] Примеры других систем для экспрессии или регуляции экспрессии включают CAR “ON-Switch” (Wu et al. (2015) Science 350: aab4077), комбинаторные системы активации (Fedorov et al. (2014) Cancer Journal 20:160-165; Kloss et al. (2013) Nature Biotechnology 31: 71-75), доксициклин-индуцируемые CAR (Sakemura et al. (2016) Cancer Immunol. Res. 4:658-668), антитело-индуцируемые CAR (Hill et al. (2018) Nature Chemical Biology 14:112-117), киллинг-переключатели (Di Stasi et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365:1673-1683 (2011); Budde et al. (2013) PLoS One 8: e82742), пауза-переключатели (Wei et al. (2012) Nature 488: 384-388), настраиваемые рецепторные системы (Ma et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E450-458; Rodgers et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E459-468; Kudo et al. (2014) Pак Res. 74: 93-103) и переключатели пролиферации (Chen et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 8531-8536).

[00146] Примеры систем продукции суперантигенов можно найти, например, в патенте США №6962694.

Лентивирусные векторы

[00147] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть ретровирусным вектором. Примеры ретровирусных векторов включают векторы вируса мышинового лейкоза Молони, векторы вируса некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус птичьего лейкоза, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы. Ретровирусные векторы можно использовать в качестве агентов для опосредования ретровирусно-опосредованного переноса генов в эукариотические клетки.

[00148] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. Иллюстративные лентивирусные векторы включают векторы, полученные из вируса иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1), вируса иммунодефицита человека-2 (ВИЧ-2), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита кошек (FIV), вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вируса болезни Джембрана (JDV), вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV) и вируса артрита-энцефалита коз (CAEV).

[00149] Ретровирусные векторы обычно конструируют таким образом, что большинство последовательностей, кодирующих структурные гены вируса, делетированы и заменены представляющим интерес геном(генами). Часто структурные гены (т.е. gag, pol и env) удаляют из ретровирусного остова с использованием методов генной инженерии, известных в данной области. Соответственно, минимальный ретровирусный вектор включает от 5' к 3': 5' длинный концевой повтор (LTR), сигнал упаковки, необязательный экзогенный промотор и/или энхансер, представляющий интерес экзогенный ген и 3' LTR. Если отсутствует экзогенный промотор, экспрессия гена управляется 5' LTR, который является слабым промотором и требует присутствия Tat для активации экспрессии. Структурные гены могут быть предоставлены в отдельных векторах для получения лентивируса, что делает продуцируемые вирионы дефектными по репликации. В частности, что касается лентивируса, система упаковки может включать один вектор упаковки, кодирующий гены Gag, Pol, Rev и Tat, и третий, отдельный вектор, кодирующий белок оболочки Env (обычно VSV-G из-за его широкой инфекционности). Для повышения безопасности системы упаковки вектор упаковки можно расщепить, экспрессируя Rev из одного вектора, Gag и Pol из другого вектора. Tat также можно удалить из системы упаковки с использованием ретровирусного вектора, включающего химерный 5'-LTR, в котором U3 область 5'-LTR заменена гетерологичным регуляторным элементом.

[00150] Гены могут быть включены в провирусный остов несколькими общими способами. Наиболее простыми конструкциями являются те, в которых структурные гены ретровируса заменены одним геном, который транскрибируется под контролем вирусных регуляторных последовательностей в LTR. Также были сконструированы ретровирусные векторы, которые могут вводить более одного гена в клетки-мишени. Обычно в таких векторах один ген находится под регуляторным контролем вирусного LTR, в то время как второй ген экспрессируется либо вне расщепленного первичного транскрипта, либо регулируется его собственным внутренним промотором.

[00151] Соответственно, новый ген(гены) фланкирован 5'- и 3'-LTR, которые способствуют транскрипции и полиаденилированию РНК вирионов, соответственно. Термин “длинный концевой повтор” или “LTR” относится к доменам из пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые, в контексте своей природной последовательности, представляют собой прямые повторы и содержат U3, R и U5 области. LTR обычно обеспечивают функции, фундаментальные для экспрессии ретровирусных генов (например, промотирование, инициация и полиаденилирование генных транскриптов) и для репликации вируса. LTR содержит многочисленные регуляторные сигналы, включая элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. U3 область содержит энхансерные и промоторные элементы. U5 область представляет собой последовательность между сайтом связывания праймера и R-областью и содержит последовательность полиаденилирования. R-область (повторяющаяся) фланкирована U3 и

U5 областями. В некоторых вариантах осуществления R-область включает генетический элемент ответа на транс-активацию (TAR), который взаимодействует с генетическим элементом транс-активатора (tat) для усиления репликации вируса. Этот элемент не требуется в вариантах осуществления, в которых U3 область 5' LTR заменена гетерологичным промотором.

[00152] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор включает модифицированный 5' LTR и/или 3' LTR. Модификации 3'-LTR часто осуществляют для повышения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем, делая вирусы дефектными по репликации. В конкретных вариантах осуществления ретровирусный вектор представляет собой самоинактивирующийся (SIN) вектор. В контексте настоящей заявки SIN ретровирусный вектор относится к дефектному по репликации ретровирусному вектору, в котором 3' LTR U3 область была модифицирована (например, путем делеции или замены) для предотвращения транскрипции вируса после первого раунда репликации вируса. Это связано с тем, что 3' LTR U3 область используется в качестве матрицы для 5' LTR U3 области во время репликации вируса, и, таким образом, вирусный транскрипт не может быть получен без U3 промотора-энхансера. В другом варианте осуществления 3'-LTR модифицируют таким образом, что U5 область заменяется, например, идеальной последовательностью полиаденилирования. Следует отметить, что модификации LTR, такие как модификации 3'-LTR, 5'-LTR или как 3'-, так и 5'-LTR, также включены в изобретение.

[00153] В некоторых вариантах осуществления U3 область 5' LTR заменена гетерологичным промотором для управления транскрипцией вирусного генома во время продуцирования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые можно использовать, включают, например, вирус обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), цитомегаловирус (CMV) (например, немедленно-анний), Вирус мышинового лейкоза Молони (MoMLV), вирус саркомы Рауса (RSV) и промоторы вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназа). Иллюстративные промоторы способны управлять высокими уровнями транскрипции независимым от Tat способом. Эта замена уменьшает возможность рекомбинации для создания способного к репликации вируса, поскольку в системе продуцирования вируса нет полной последовательности U3.

[00154] Рядом с 5' LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома и для эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (сайт Psi). В контексте настоящей заявки термин “сигнал упаковки” или “последовательность упаковки” относится к последовательностям, расположенным в ретровирусном геноме, которые необходимы для инкапсидации цепей ретровирусной РНК в процессе образования вирусных частиц (см., например, Clever et al., 1995 J. Virology, 69(4):2101-09). Сигнал упаковки может представлять собой минимальный сигнал упаковки (также называемый последовательностью пси [Ψ]), необходимый для инкапсуляции вирусного генома.

[00155] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор (например,

лентивирусный вектор) дополнительно включает ФЛЭП. В контексте настоящей заявки термин «ФЛЭП» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой включает центральный полипуриновый тракт и центральные терминирующие последовательности (сРРТ и СТС) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие ФЛЭП элементы описаны в патенте США № 6682907 и Zennou et al. (2000) Cell, 101:173. В ходе обратной транскрипции центральная инициация ДНК плюс-цепи на сРРТ и центральная терминация на СТС приводят к образованию трехцепочечной структуры ДНК: центральной флэп-структуры ДНК. Не желая быть связанными какой-либо теорией, флэп ДНК может действовать как цис-активная детерминанта ядерного импорта лентивирусного генома и/или может увеличивать титр вируса. В конкретных вариантах осуществления остовы ретровирусных векторов содержат один или несколько ФЛЭП элементов выше или ниже интересующих гетерологичных генов в векторах. Например, в конкретных вариантах осуществления плазмиды-переносчик включает ФЛЭП элемент. В одном варианте осуществления вектор по изобретению включает ФЛЭП элемент, выделенный из ВИЧ-1.

[00156] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор) дополнительно содержит экспортный элемент. В одном варианте осуществления ретровирусные векторы содержат один или несколько экспортных элементов. Термин «экспортный элемент» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует транспорт транскрипта РНК из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, но не ограничиваются этим, RRE вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Cullen et al., (1991) J. VIROL. 65: 1053; и Cullen et al., (1991) CELL 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE). Как правило, элемент экспорта РНК расположен в 3'-UTR гена и может быть вставлен в виде одной или нескольких копий.

[00157] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор) дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент. Различные посттранскрипционные регуляторные элементы могут увеличивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE; см. Zufferey et al., (1999) J. VIROL., 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang et al., MOL. CELL. BIOL., 5:3864); и т.п. (Liu et al., (1995), GENES DEV., 9:1766). Посттранскрипционный регуляторный элемент обычно расположен на 3'-конце гетерологичной нуклеиновокислотной последовательности. Эта конфигурация приводит к синтезу транскрипта мРНК, 5'-часть которого включает гетерологичные нуклеиновокислотные кодирующие последовательности, а 3'-часть которого содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления в векторах по изобретению отсутствует, или они не включают, посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как WPRE или HPRE, поскольку в некоторых случаях эти элементы повышают риск клеточной трансформации и/или не

приводят к существенному или значительному повышению количества транскрипта мРНК или повышению стабильности мРНК. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления в векторах по изобретению отсутствуют, или они не включают, WPRE или HPRE, добавляемые в целях безопасности.

[00158] Элементы, управляющие эффективной терминацией и полиаденилированием гетерологичных транскриптов нуклеиновых кислот, увеличивают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся ниже сигнала полиаденилирования. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор) дополнительно включает сигнал полиаденилирования. Термин «сигнал полиаденилирования» или «последовательность полиаденилирования», используемый в настоящей заявке, означает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием формирующегося РНК-транскрипта под действием РНК-полимеразы II. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта желательно, поскольку транскрипты, не имеющие сигнала полиаденилирования, неустойчивы и быстро разрушаются. Иллюстративные примеры сигналов полиаденилирования, которые можно использовать в векторе по изобретению, включают идеальную последовательность полиаденилирования (например, ААТAAA, АТТAAA АГТAAA), последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHrA), последовательность полиаденилирования β -глобина кролика (r β gpA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную последовательность полиаденилирования, известную в данной области.

[00159] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор дополнительно включает инсуляторный элемент. Инсуляторные элементы могут способствовать защите ретровирус-экспрессируемых последовательностей, например, терапевтических генов, от эффектов сайта интеграции, которые могут быть опосредованы цис-действующими элементами, присутствующими в геномной ДНК, и приводить к нарушению регуляции экспрессии переносимых последовательностей (т.е. эффект положения; см. например, Burgess-Beusse et al., (2002) PROC.NATL.ACAD.SCI., USA, 99:16433 и Zhan et al., 2001, HUM.GENET., 109:471). В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор включает инсуляторный элемент в одном или обоих LTR или в другом месте в области вектора, который интегрируется в клеточный геном. Подходящие инсуляторы для использования в изобретении включают, но не ограничиваются этим, инсулятор β -глобина кур (см. Chung et al., (1993). CELL 74:505; Chung et al., (1997) PROC. NATL. ACAD. SCI., USA 94:575 и Bell et al., 1999. CELL 98:387). Примеры инсуляторных элементов включают, но не ограничиваются этим, инсулятор из локуса β -глобина, такой как куриный HS4.

[00160] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают pLVX-EF1alpha-AcGFP1-C1 (Clontech Catalog #631984), pLVX-EF1alpha-IRES-mCherry (Clontech Catalog #631987), pLVX-Puro (Clontech Catalog #632159), pLVX-IRES-Puro (Clontech

Catalog #632186), pLenti6/V5-DEST™ (Thermo Fisher), pLenti6,2/V5-DEST™ (Thermo Fisher), pLKO.1 (Плазмида #10878 в Addgene), pLKO.3G (Плазмида #14748 в Addgene), pSico (Плазмида #11578 в Addgene), pLJM1-EGFP (Плазмида #19319 в Addgene), FUGW (Плазмида #14883 в Addgene), pLVTHM (Плазмида #12247 в Addgene), pLVUT-tTR-KRAB (Плазмида #11651 в Addgene), pLL3.7 (Плазмида #11795 в Addgene), pLB (Плазмида #11619 в Addgene), pWPXL (Плазмида #12257 в Addgene), pWPI (Плазмида #12254 в Addgene), EF.CMV.RFP (Плазмида #17619 в Addgene), pLenti CMV Puro DEST (Плазмида #17452 в Addgene), pLenti-puro (Плазмида #39481 в Addgene), pULTRA (Плазмида #24129 в Addgene), pLX301 (Плазмида #25895 в Addgene), pВИЧ-EGFP (Плазмида #21373 в Addgene), pLV-mCherry (Плазмида #36084 в Addgene), pLionII (Плазмида #1730 в Addgene), pInducer10-mir-RUP-PheS (Плазмида #44011 в Addgene). Эти векторы можно модифицировать, чтобы они были подходящими для терапевтического применения. Например, селективный маркер (например, puro, EGFP или mCherry) может быть делегирован или заменен вторым экзогенным геном, представляющим интерес. Дополнительные примеры лентивирусных векторов раскрыты в патентах США №№ 7629153, 7198950, 8329462, 6863884, 6682907, 7745179, 7250299, 5994136, 6287814, 6013516, 6797512, 6544771, 5834256, 6958226, 6207455, 6531123 и 6352694 и в публикации РСТ № WO2017/091786.

Аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы

[00161] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. AAV представляет собой небольшой икосаэдрический вирус без оболочки, относящийся к роду *Dependoviriovirus* и семейству *Parvovirus*. AAV имеет геном одноцепочечной линейной ДНК размером примерно 4,7 т.п.н. AAV способен инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки нескольких типов тканей, при этом разные серотипы AAV проявляют разный тропизм к тканям.

[00162] AAV включает множество серологически различимых типов, включая серотипы от AAV-1 до AAV-12, а также более 100 серотипов от отличных от человека приматов (см., например, Srivastava (2008) J. CELL BIOCHEM., 105(1): 17-24, и Gao et al. (2004) J. Virol., 78(12), 6381-6388). Серотип AAV вектора, используемого в настоящем изобретении, может быть выбран специалистом в данной области на основании эффективности доставки, тропизма к тканям и иммуногенности. Например, AAV-1, AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-8 и AAV-9 можно использовать для доставки в центральную нервную систему; AAV-1, AAV-8 и AAV-9 можно использовать для доставки в сердце; AAV-2 можно использовать для доставки в почку; AAV-7, AAV-8 и AAV-9 можно использовать для доставки в печень; AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-9 можно использовать для доставки в легкое, AAV-8 можно использовать для доставки в поджелудочную железу, AAV-2, AAV-5 и AAV-8 можно использовать для доставки в фоторецепторные клетки; AAV-1, AAV-2, AAV-4, AAV-5 и AAV-8 можно использовать для доставки в пигментный эпителий сетчатки; AAV-1, AAV-6, AAV-7, AAV-8 и AAV-9 можно

использовать для доставки в скелетную мышцу. В некоторых вариантах осуществления AAV капсидный белок включает последовательность, раскрытую в патенте США № 7198951, такую как, но не ограничиваясь этим, AAV-9 (SEQ ID NO: 1-3 патента США № 7198951), AAV-2 (SEQ ID NO: 4 патента США № 7198951), AAV-1 (SEQ ID NO: 5 патента США № 7198951), AAV-3 (SEQ ID NO: 6 патента США № 7198951) и AAV-8 (SEQ ID NO: 7 патента США № 7198951). AAV серотипы, идентифицированные у макака-rhesus, например, rh.8, rh.10, rh.39, rh.43 и rh.74, также предусматриваются в настоящем изобретении. Помимо природных серотипов AAV, были разработаны модифицированные капсиды AAV для улучшения эффективности доставки, тропизма к ткани и иммуногенности. Примеры природных и модифицированных капсидов AAV раскрыты в патентах США № 7906111, 9493788 и 7198951 и публикации РСТ № WO2017189964A2.

[00163] Геном AAV дикого типа содержит два включающих 145 нуклеотидов инвертированных концевых повтора (ITR), которые содержат сигнальные последовательности, направляющие репликацию AAV, инкапсуляцию генома и интеграцию. В дополнение к ITR три промотора AAV, p5, p19 и p40, управляют экспрессией двух открытых рамок считывания, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV приводят к продукции четырех белков гер (Rep 78, Rep 68, Rep 52 и Rep 40) из гена гер. Белки гер отвечают за репликацию генома. Ген Сар экспрессируется с промотора p40 и кодирует три капсидных белка (VP1, VP2 и VP3), которые представляют собой сплайс-варианты гена сар. Эти белки образуют капсид частицы AAV.

[00164] Поскольку цис-действующие сигналы для репликации, инкапсидации и интеграции содержатся в пределах этих ITR, часть или весь внутренний геном размером 4,3 т.п.н. может быть заменен чужеродной ДНК, например, кассетой экспрессии для представляющего интерес экзогенного гена. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления AAV вектор включает геном, включающий экспрессионную кассету для экзогенного гена, фланкированную 5'-ITR и 3'-ITR. ITR могут быть получены из того же серотипа, что и капсид или его производное. Альтернативно, ITR могут относиться к серотипу, отличному от капсида, что приводит к образованию псевдотипированного AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR происходят из AAV-2. В некоторых вариантах осуществления ITR происходят из AAV-5. По меньшей мере один из ITR может быть модифицирован для мутации или делеции сайта концевой разрешения, что позволяет получить самокомплементарный AAV вектор.

[00165] Rep и сар белки могут представлены в *транс*, например, на плазмиде, для получения AAV вектора. Линия клеток-хозяев, допускающая репликацию AAV, должна экспрессировать гены гер и сар, экспрессионную кассету, фланкированную ITR, и хелперные функции, обеспечиваемые хелперным вирусом, например, аденовирусные гены E1a, E1b55K, E2a, E4orf6, and VA (Weitzman et al., Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols, pp. 1-23, 2011). Подробно описаны способы создания и очистки AAV векторов (см., например, Mueller et al., (2012) CURRENT

PROTOCOLS IN MICROBIOLOGY, 14D.1.1-14D.1.21, Production and Discovery of Novel Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors). Для получения AAV векторов подходят многочисленные типы клеток, включая клетки HEK293, клетки COS, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки Vero, а также клетки насекомых (см., например, патенты США №№ 6156303, 5387484, 5741683, 5691176, 5688676 и 8163543, патентную публикацию США № 20020081721 и публикации РСТ № WO00/47757, WO00/24916 и WO96/17947). AAV векторы обычно продуцируют в этих типах клеток с использованием одной плазмиды, содержащей ITR-фланкированную экспрессионную кассету, и одной или нескольких дополнительных плазмид, обеспечивающих дополнительные гены AAV и хелперного вируса.

[00166] В настоящем изобретении можно использовать AAV любого серотипа. Аналогичным образом предполагается, что можно использовать любой тип аденовируса, и специалист в данной области техники сможет идентифицировать AAV и аденовирусные типы, подходящие для получения желаемого рекомбинантного AAV вектора (rAAV). Частицы AAV могут быть очищены, например, с использованием аффинной хроматографии, градиента йодиксоналя или градиента CsCl.

[00167] AAV векторы могут иметь одноцепочечные геномы размером 4,7 т.п.н. или больше или меньше 4,7 т.п.н., включая геномы такого большого размера, как 5,2 т.п.н., или такого малого размера, как 3,0 т.п.н. Таким образом, если представляющий интерес экзогенный ген, экспрессируемый из AAV вектора, мал, геном AAV может содержать “лишнюю” последовательность. Кроме того, векторные геномы могут быть по существу самокомплементарными, что обеспечивает быструю экспрессию в клетке. В некоторых вариантах осуществления геном самокомплементарного AAV вектора включает от 5' до 3': 5'-ITR; первую последовательность нуклеиновой кислоты, включающую промотор и/или энхансер, функционально связанный с кодирующей последовательностью представляющего интерес гена; модифицированный ITR, который не имеет функционального сайта концевой разрешения; вторую последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную или по существу комплементарную первой последовательности нуклеиновой кислоты; и 3' ITR. AAV векторы, содержащие геномы всех типов, подходят для использования в способе по настоящему изобретению.

[00168] Неограничивающие примеры AAV векторов включают pAAV-MCS (Agilent Technologies), pAAVK-EF1 α -MCS (System Bio Catalog # AAV502A-1), pAAVK-EF1 α -MCS1-CMV-MCS2 (System Bio Catalog # AAV503A-1), pAAV-ZsGreen1 (Clontech Catalog #6231), pAAV-MCS2 (Addgene Плазмида #46954), AAV-Stuffer (Addgene Плазмида #106248), pAAVscCBPIGpluc (Addgene Плазмида #35645), AAVS1_Puro_PGK1_3xFLAG_Twin_Strep (Addgene Плазмида #68375), pAAV-RAM-d2TTA::TRE-MCS-WPRE-pA (Addgene Плазмида #63931), pAAV-UbC (Addgene Плазмида #62806), pAAVS1-P-MCS (Addgene Плазмида #80488), pAAV-Gateway (Addgene Плазмида #32671), pAAV-Puro_siKD (Addgene Плазмида #86695), pAAVS1-Nst-MCS (Addgene Плазмида #80487), pAAVS1-Nst-CAG-DEST (Addgene Плазмида #80489), pAAVS1-P-

CAG-DEST (Addgene Плазмида #80490), pAAVf-EnhCB-lacZnls (Addgene Плазмида #35642) и pAAVS1-shRNA (Addgene Плазмида #82697). Эти векторы можно модифицировать, чтобы они были подходящими для терапевтического применения. Например, экзогенный ген, представляющий интерес, может быть встроен в сайт множественного клонирования, а селективный маркер (например, puo или ген, кодирующий флуоресцентный белок) может быть делетирован или заменен другим (таким же или отличным от него) экзогенным геном, представляющим интерес. Дополнительные примеры AAV векторов раскрыты в патентах США №№ 5871982, 6270996, 7238526, 6943019, 6953690, 9150882 и 8298818, патентной публикации США № 2009/0087413 и РСТ публикациях №№ WO2017075335A1, WO2017075338A2 и WO2017201258A1.

Аденовирусные векторы

[00169] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой аденовирусный вектор. Аденовирусы представляют собой среднего размера (90-100 нм), безоболочечные (голые), икосаэдрические вирусы, состоящие из нуклеокапсида и двухцепочечного линейного ДНК генома. Термин «аденовирус» относится к любому вирусу рода Adenoviridae, включая, но не ограничиваясь этим, подроды аденовирусов человека, крупного рогатого скота, овец, лошадей, собак, свиней, мышей и обезьян. Как правило, аденовирусный вектор создается путем введения одной или нескольких мутаций (например, делеций, вставок или замен) в аденовирусный геном аденовируса, чтобы обеспечить вставку ненативной нуклеиновокислотной последовательности, например, для переноса гена, в аденовирус.

[00170] В качестве источника аденовирусного генома для аденовирусного вектора можно использовать аденовирус человека. Например, аденовирус может относиться к подгруппе А (например, серотипы 12, 18 и 31), подгруппе В (например, серотипы 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35 и 50), подгруппе С (например, серотипы 1, 2, 5 и 6), подгруппе D (например, серотипы 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39 и 42-48), подгруппе Е (например, серотип 4), подгруппе F (например, серотипы 40 и 41), неклассифицированной серогруппе (например, серотипы 49 и 51) или любой другой аденовирусной серогруппе или серотипу. Аденовирусные серотипы с 1 по 51 доступны в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, Virginia). Не относящиеся к группе С аденовирусные векторы, способы получения не относящихся к группе С аденовирусных векторов и способы использования не относящихся к группе С аденовирусных векторов раскрыты, например, в патентах США №№ 5801030, 5837511 и 5849561, а также в публикациях РСТ №№ WO1997/012986 и WO1998/053087.

[00171] Нечеловеческий аденовирус (например, аденовирусы приматов, обезьян, птиц, собак, овец или крупного рогатого скота) можно использовать для создания аденовирусного вектора (т.е. в качестве источника аденовирусного генома для аденовирусного вектора). Например, аденовирусный вектор может быть основан на аденовирусе обезьян, включая обезьян как Нового, так и Старого Света (см., например, Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses

(2005)). Анализ филогении аденовирусов, инфицирующих приматов, описан, например, в Roy et al. (2009) *PLoS PATHOG.* 5(7):e1000503. Аденовирус гориллы может быть использован в качестве источника аденовирусного генома для аденовирусного вектора. Аденовирусы гориллы и аденовирусные векторы описаны, например, в публикациях РСТ № WO 2013/052799, WO 2013/052811 и WO 2013/052832. Аденовирусный вектор также может включать комбинацию подтипов и, таким образом, быть «химерным» аденовирусным вектором.

[00172] Аденовирусный вектор может быть репликационно-компетентным, условно репликационно-компетентным или репликационно-дефицитным. Репликационно-компетентный аденовирусный вектор может реплицироваться в типичных клетках-хозяевах, т.е. клетках, которые обычно могут быть инфицированы аденовирусом. Условно реплицирующийся аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, который был сконструирован для репликации в заранее определенных условиях. Например, важные для репликации функции гена, например, функции гена, кодируемые ранними областями аденовируса, могут быть функционально связаны с индуцируемой, репрессируемой или тканеспецифичной последовательностью контроля транскрипции, например, промотором. Условно реплицирующиеся аденовирусные векторы также описаны в патенте США № 5998205. Репликационно-дефицитный аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, который требует комплементации одной или нескольких генных функций или областей аденовирусного генома, необходимых для репликации, в результате, например, дефицита одной или нескольких важных для репликации генных функций или областей, так что аденовирусный вектор не реплицируется в типичных клетках-хозяевах, особенно в клетках человека, который должен быть инфицирован аденовирусным вектором.

[00173] Предпочтительно аденовирусный вектор является репликационно-дефицитным, таким образом, репликационно-дефицитный аденовирусный вектор требует комплементации по меньшей мере одной важной для репликации генной функции одной или нескольких областей аденовирусного генома для размножения (например, для образования частиц аденовирусного вектора). Аденовирусный вектор может быть с дефицитом одной или нескольких важных для репликации генных функций только ранних областей (т.е. областей E1-E4) аденовирусного генома, только поздних областей (т.е. областей L1-L5) аденовирусного генома, как ранних, так и поздних областей аденовирусного генома или всех аденовирусных генов (т.е. аденовектор высокой емкости (HC-Ad)). См., например, Morsy et al. (1998) *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* 95: 965-976, Chen et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1645-1650, and Kochanek et al. (1999) *Hum. Gene Ther.* 10(15):2451-9. Примеры репликационно-дефицитных аденовирусных векторов раскрыты в патентах США №№ 5837511, 5851806, 5994106, 6127175, 6482616, и 7,195,896, и РСТ публикациях №№ WO1994/028152, WO1995/002697, WO1995/016772, WO1995/034671, WO1996/ 022378, WO1997/012986, WO1997/021826 и WO2003/022311.

[00174] Репликационно-дефицитный аденовирусный вектор по изобретению может быть получен в комплементарных клеточных линиях, которые обеспечивают генные функции, отсутствующие в репликационно-дефицитном аденовирусном векторе, но необходимые для размножения вируса, на соответствующих уровнях, чтобы генерировать высокие титры исходного раствора вирусного вектора. Такие комплементарные клеточные линии известны и включают, но не ограничиваются этим, клетки 293 (описанные, например, в Graham et al. (1977) J. GEN. VIROL. 36: 59-72), клетки PER.C6 (описанные, например, в публикации РСТ № WO1997/000326 и патентах США №№ 5994128 и 6033908) и клетки 293-ORF6 (описанные, например, в публикации РСТ № WO1995/034671 и Brough et al. (1997) J. VIROL 71: 9206-9213). Другие подходящие линии комплементарных клеток для получения репликационно-дефицитного аденовирусного вектора по изобретению включают комплементарные клетки, которые были созданы для размножения аденовирусных векторов, кодирующих трансгены, экспрессия которых ингибирует вирусный рост в клетках-хозяевах (см., например, патентную публикацию США № 2008/0233650). Дополнительные подходящие комплементарные клетки описаны, например, в патентах США №№ 6677156 и 6682929 и публикации РСТ № WO 2003/020879. Лекарственные формы для содержащих аденовирусный вектор композиций также описаны, например, в патентах США №№ 6225289 и 6514943 и публикации РСТ № WO2000/034444.

[00175] Дополнительные иллюстративные аденовирусные векторы и/или способы получения или размножения аденовирусных векторов описаны в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191, 6,083,716, 6113913, 6303362, 7067310 и 9073980.

[00176] Коммерчески доступные аденовирусные векторные системы включают систему экспрессии аденовирусов ViraPower™, доступную от Thermo Fisher Scientific, аденовирусную векторную систему AdEasy™, доступную от Agilent Technologies, и экспрессионную систему 3 Adeno-X™, доступную от Takara Bio USA, Inc.

Получение вирусных векторов

[00177] Способы получения вирусных векторов известны в данной области. Как правило, представляющий интерес вирус продуцируют в подходящей линии клеток-хозяев с использованием обычных способов, включая культивирование трансфицированной или инфицированной клетки-хозяина в подходящих условиях, позволяющих получить инфекционные вирусные частицы. Нуклеиновые кислоты, кодирующие вирусные гены и/или представляющие интерес гены, могут быть включены в плазмиды и введены в клетки-хозяева с использованием обычных методов трансфекции или трансформации. Примеры подходящих клеток-хозяев для продукции описанных вирусов включают линии клеток человека, такие как клетки HeLa, Hela-S3, HEK293, 911, A549, HER96 или PER-C6. Конкретные условия получения и очистки будут варьироваться в зависимости от вируса и используемой системы продуцирования.

[00178] В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты могут быть введены непосредственно субъекту, однако в других вариантах осуществления после их продуцирования инфекционные вирусные частицы извлекают из культуры и необязательно очищают. Типичные стадии очистки могут включать очистку от бляшек, центрифугирование, например, центрифугирование в градиенте хлорида цезия, осветление, ферментативную обработку, например, обработку бензоназой или протеазой, хроматографические стадии, например, ионообменную хроматографию, или стадии фильтрации.

Очистка белка

[00179] Конъюгаты суперантигена и/или суперантиген-нацеливающего фрагмента предпочтительно очищают перед использованием, что можно осуществить с использованием различных протоколов очистки. После отделения конъюгата суперантигена или суперантиген-нацеливающего фрагмента от других белков представляющий интерес белок может быть дополнительно очищен с использованием 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; изоэлектрическую фокусировку. Термин «очищенный», используемый в настоящей заявке, предназначен для обозначения композиции, которую можно отделить от других компонентов, в которой представляющая интерес макромолекула (например, белок) очищена до любой степени по сравнению с ее исходным состоянием. Как правило, термин «очищенный» относится к макромолекуле, которая была подвергнута фракционированию для удаления различных других компонентов и которая по существу сохраняет свою биологическую активность. Термин «по существу очищенный» относится к композиции, в которой представляющая интерес макромолекула образует основной компонент композиции, например, составляющая около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95% или более содержимого композиции.

[00180] Различные способы количественного определения степени очистки белка известны специалистам в данной области, включая, например, определение специфической активности активной фракции и оценку количества данного белка во фракции с использованием SDS-PAGE анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или любого другого метода фракционирования. Различные методы, подходящие для использования при очистке белков, включают, например, преципитацию сульфатом аммония, ПЭГ, антителами и т.п. или денатурацию нагреванием с последующим центрифугированием; хроматографические стадии, такие как ионный обмен, гель-фильтрация, обращенно-фазовая, гидроксиапатитная, аффинная хроматография; изоэлектрическую фокусировку; гель-электрофорез; и комбинации таких и других методов. Предполагается, что порядок осуществления различных стадий очистки

можно изменить или что определенные стадии могут быть исключены, и все же это приведет к подходящему способу получения по существу очищенного белка или пептида.

V. Фармацевтические композиции

[00181] Для терапевтического применения иммунную клетку (например, выделенную природную иммунную клетку или сконструированную иммунную клетку, описанную в настоящей заявке) и/или конъюгат суперантигена предпочтительно объединяют с фармацевтически приемлемым носителем. Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в настоящей заявке, относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соответствуя разумному соотношению польза/риск.

[00182] Термин «фармацевтически приемлемый носитель», используемый в настоящей заявке, относится к буферам, носителям и эксципиентам, подходящим для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые носители включают любые стандартные фармацевтические носители, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

[00183] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать используемые для получения композиции вещества для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. В таких вариантах осуществления подходящие используемые для получения композиции вещества включают, но не ограничиваются этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); создающие объем вещества (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразователи (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как

глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалконий хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); носители для доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд. (Mack Publishing Company, 1990).

[00184] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать наночастицы, например, полимерные наночастицы, липосомы или мицеллы (см. Anselmo et al. (2016) BIOENG. TRANSL. MED. 1: 10-29).

[00185] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать композицию для пролонгированной или контролируемой доставки. Специалистам в данной области техники также известны способы получения средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомальные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые шарики и депо инъекции. Препараты пролонгированного действия могут включать, например, пористые полимерные микрочастицы или полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать полиэферы, гидрогели, полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, поли(2-гидроксиэтилитакрилат), этиленвинилацетат или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые можно получить любым из нескольких способов, известных в данной области.

[00186] Фармацевтические композиции, содержащие иммунную клетку и/или конъюгат суперантигена, раскрытые в настоящей заявке, могут быть представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна быть сформулирована таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым путем введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в/в), внутримышечное, внутрикожное, ингаляционное, чрескожное, местное, трансмукозальное, интратекальное и ректальное введение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую иммунную клетку и/или конъюгат суперантигена, раскрытые в настоящей заявке, вводят путем в/в

инфузии. Альтернативно, лекарственные средства можно вводить местно, а не системно, например, путем инъекции лекарственного средства или средств непосредственно в место действия, часто в форме депо препарата или препарата с замедленным высвобождением. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую иммунную клетку и/или конъюгат суперантигена, раскрытые в настоящей заявке, вводят путем интратуморальной инъекции.

[00187] Полезные композиции можно получить способами, известными в области фармацевтики. Например, см. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты композиции, подходящей для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как EDTA; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

[00188] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Носитель должен быть стабилен в условиях производства и хранения и должен быть защищен от микроорганизмов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[00189] Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными. Стерилизацию можно осуществить любым подходящим способом, например, фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию фильтрованием можно осуществить до или после лиофилизации и восстановления.

[00190] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере около 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может составлять от примерно 2% до около 75% массы единицы или, например, от около 25% до около 60%, и находиться в любом диапазоне, который можно вывести из вышеуказанных. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полужизни, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические соображения должны учитываться специалистом в области получения таких фармацевтических композиций, и, соответственно, различные дозировки и схемы лечения могут быть желательны. Такие определения известны и используются специалистами в данной области.

[00191] Активные средства вводят в количестве или количествах, эффективных для уменьшения, снижения, ингибирования или иного устранения роста или пролиферации

раковых клеток, индукции апоптоза, ингибирования ангиогенеза рака или опухоли, ингибирования метастазирования или индукции цитотоксичности в клетках. Эффективное количество активного соединения (соединений), используемого для практического применения настоящего изобретения для терапевтического лечения рака, варьируется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. Эти условия включают синергетические ситуации, когда отдельное средство, такое как конъюгат суперантигена или иммунная клетка, может действовать слабо или вообще не действовать, но в сочетании друг с другом, например, но не ограничиваясь этим, при последовательном введении, эти два или более средств действуют, обеспечивая синергетический результат.

[00192] Как правило, терапевтически эффективное количество активного компонента находится в диапазоне 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. Вводимое количество будет зависеть от переменных, таких как тип и степень заболевания или показания к лечению, общее состояние здоровья пациента, эффективность антитела *in vivo*, фармацевтическая композиция и путь введения. Начальная доза может быть увеличена сверх верхнего уровня для быстрого достижения желаемого уровня в крови или в тканях. Альтернативно, начальная доза может быть меньше оптимальной, а суточная доза может постепенно увеличиваться в ходе курса лечения. Дозировка для человека может быть оптимизирована, например, стандартное исследование повышения дозы фазы I рассчитано на введение от 0,5 мг/кг до 20 мг/кг. Частота введения может варьироваться в зависимости от таких факторов, как способ введения, величина дозы, период полужизни антитела в сыворотке и заболевание, которое лечат. Например, частота введения составляет один раз в день, один раз в неделю и один раз в две недели. Предпочтительным путем введения является парентеральный, например, внутривенная инфузия. В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена лиофилизируют, а затем восстанавливают в забуференном солевом растворе во время введения.

[00193] В некоторых неограничивающих примерах доза выделенных, природных или сконструированных иммунных клеток, *например*, Т-клеток, находится в пределах, *например*, 10^5 - 10^9 клеток/кг, 10^5 - 10^8 клеток/кг, 10^5 - 10^7 клеток/кг, 10^5 - 10^6 клеток/кг, 10^6 - 10^9 клеток/кг, 10^6 - 10^8 клеток/кг, 10^6 - 10^7 клеток/кг, 10^7 - 10^9 клеток/кг, 10^7 - 10^8 клеток/кг или 10^8 - 10^9 клеток/кг, или 10^6 - 10^{11} общего количества клеток, 10^6 - 10^{10} общего количества клеток, 10^6 - 10^9 общего количества клеток, 10^6 - 10^8 общего количества клеток, 10^6 - 10^7 общего количества клеток, 10^7 - 10^{11} общего количества клеток, 10^7 - 10^{10} общего количества клеток, 10^7 - 10^9 общего количества клеток, 10^7 - 10^8 общего количества клеток, 10^8 - 10^{11} общего количества клеток, 10^8 - 10^{10} общего количества клеток, 10^8 - 10^9 общего количества клеток, 10^9 - 10^{11} общего количества клеток, 10^9 - 10^{10} общего количества клеток или 10^{10} - 10^{11} общего количества клеток. Вводимое количество будет зависеть от переменных, таких как тип и степень заболевания или показания к лечению, общее состояние здоровья пациента, эффективность антитела *in vivo*, фармацевтическая композиция и путь введения. Прогресс

можно отслеживать путем периодической оценки.

[00194] В некоторых неограничивающих примерах доза конъюгата суперантигена также может включать от около 1 мкг/кг/массы тела, около 5 мкг/кг/массы тела, около 10 мкг/кг/массы тела, около 15 мкг/кг/массы тела, около 20 мкг/кг/массы тела, около 50 мкг/кг/массы тела, около 100 мкг/кг/массы тела, около 200 мкг/кг/массы тела, около 350 мкг/кг/массы тела, около 500 мкг/кг/массы тела, около 1 мг/кг/массы тела, около 5 мг/кг/массы тела, около 10 мг/кг/массы тела, около 50 мг/кг/массы тела, около 100 мг/кг/массы тела, около 200 мг/кг/массы тела, около 350 мг/кг/массы тела, около 500 мг/кг/массы тела, до около 1000 мг/кг/массы тела или более на введение и может находиться в любом диапазоне, который можно вывести из вышеуказанных. Неограничивающие примеры диапазона, выводимого из перечисленных выше цифровых значений, включают диапазон от около 5 мг/кг/массы тела до около 100 мг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 500 мг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 100 мг/кг/массы тела. Другие иллюстративные диапазоны доз представляют собой дозы от около 1 мкг/кг/массы тела до около 1000 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 75 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 50 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 40 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 30 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 20 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 15 мкг/кг/массы тела, от около 1 мкг/кг/массы тела до около 10 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 1000 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 75 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 50 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 40 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 30 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 20 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 15 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 10 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 1000 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 75 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 50 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 40 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 30 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 20 мкг/кг/массы тела, от около 10 мкг/кг/массы тела до около 15 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 1000 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 75 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 50 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 40 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 30 мкг/кг/массы тела, от около 15 мкг/кг/массы тела до около 20 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около 1000 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около 75 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около

50 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около 40 мкг/кг/массы тела, от около 20 мкг/кг/массы тела до около 30 мкг/кг/массы тела и т.д., которые можно вводить, на основании цифровых значений, описанных выше.

[00195] В некоторых вариантах осуществления, например, введения конъюгата суперантигена, вводимое эффективное количество или доза конъюгата суперантигена составляет от 0,01 до 500 мкг/кг массы тела субъекта, например, 0,1-500 мкг/кг массы тела субъекта, и, например, 1-100 мкг/кг массы тела субъекта.

[00196] Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить местно или системно. Введение, как правило, будет представлять собой парентеральное введение. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно, а в еще более предпочтительном варианте осуществления внутривенно. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии.

VI. Терапевтические применения

[00197] Композиции и способы, раскрытые в настоящей заявке, можно использовать для лечения различных форм рака у субъекта или ингибирования роста рака у субъекта. Изобретение обеспечивает способ лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества описанных иммунных клеток и/или конъюгата суперантигена либо отдельно, либо в комбинации с другим терапевтическим средством для лечения рака у субъекта. Например, раскрытые иммунные клетки и/или конъюгат суперантигена можно вводить субъекту для замедления скорости роста раковых клеток, снижения частоты или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимуляции иммунного ответа против раковых клеток или опухоли, предотвращения или ингибирования прогрессирования рака, например, по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100%. Альтернативно, иммунные клетки и/или конъюгат суперантигена можно вводить субъекту для лечения рака, например, для увеличения продолжительности жизни субъекта с раком, например, на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 1 год, 5 лет или 10 лет.

[00198] Предпочтительно, чтобы пациенты, подлежащие лечению, имели адекватную функцию костного мозга (определяемую как абсолютное количество гранулоцитов периферической крови $>2000/\text{мм}^3$ и количество тромбоцитов $100000/\text{мм}^3$), адекватную функцию печени (билирубин $<1,5$ мг/дл) и адекватную функцию почек (креатинин $<1,5$ мг/дл).

[00199] Предполагается, что ряд видов рака можно лечить с использованием описанных в настоящей заявке способов и композиций, включая, но не ограничиваясь этим, первичную или метастатическую меланому, аденокарциному, плоскоклеточную карциному, аденоплоскоклеточную карциному, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы,

рак толстой кишки, множественную миелому, нейробластому, NPC, рак мочевого пузыря, рак шейки матки и т.п.

[00200] Кроме того, рак, который можно лечить с использованием способов и композиций, описанных в настоящей заявке, может быть основан на локализации органа и/или системе, подлежащей лечению, например, но не ограничиваясь этим, кость (например, опухоли семейства Юинга, остеосаркома); головной мозг (например, опухоль головного мозга у взрослых, (например, опухоль головного мозга у взрослых, глиома ствола головного мозга (детский возраст), астроцитомы мозжечка (детский возраст), церебральная астроцитомы/злокачественная глиома (детский возраст), эпендимомы (детский возраст), медуллобластома (детский возраст), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома (детский возраст), глиома зрительного пути и гипоталамуса (детский возраст) и детская опухоль головного мозга (другие)); молочная железа (например, рак молочной железы у женщин или мужчин); пищеварительный/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 (у взрослых, первичный), рак печени (детский), рак поджелудочной железы, рак тонкой кишки, рак желудка (гастральный рак); эндокринная система (например, аденокарцинома, карциноидная опухоль (желудочно-кишечный тракт), островково-клеточная карцинома (эндокринная поджелудочная железа), рак паращитовидной железы, феохромоцитомы, опухоль гипофиза, рак щитовидной железы); глаз (например, меланома (внутриглазная), ретинобластома); мочеполовая система (например, рак мочевого пузыря, рак почки (почечно-клеточный), рак полового члена, рак предстательной железы, рак почечной лоханки и мочеточника (переходноклеточный), тестикулярный рак, рак уретры, опухоль Вильмса и другие детские опухоли почек); половые клетки (например, экстракраниальная герминогенная опухоль (детская), экстрагонадная герминогенная опухоль, герминогенная опухоль яичников, тестикулярный рак яичек); гинекологические опухоли (например, рак шейки матки, рак эндометрия, гестационная трофобластическая опухоль, эпителиальный рак яичников, зародышево-клеточная опухоль яичников, опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы); опухоли головы и шеи (например, рак гипотарингеальной области, рак гортани, рак губы и полости рта, метастатический сквамозный рак шеи с оккультной первичной опухолью, рак носоглотки, рак ротоглотки, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак слюнной железы); легкие (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких); лимфома (например, лимфома, связанная со СПИДом, кожная Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина (у взрослых), лимфома Ходжкина (у детей), лимфома Ходжкина во время беременности, грибковидный 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, опухоли семейства опухолей Юинга, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, рабдомиосаркома (у детей), саркома мягких тканей (у взрослых), саркома мягких тканей (у детей), саркома матки); неврологические опухоли (например, опухоль головного мозга у взрослых, опухоль головного мозга у детей (например, глиома ствола головного мозга, астроцитомы мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественная глиома, эпендимомы, медуллобластома, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома, глиома зрительного пути и гипоталамуса, другие опухоли головного мозга), нейробластома, опухоль гипофиза, первичная лимфома центральной нервной системы); дыхательная система/грудной отдел (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома, тимомы и карциномы тимуса); и кожа (например, кожная Т-клеточная лимфома, саркома Капоши, меланома и рак кожи).

[00201] Должно быть понятно, что способ можно использовать для лечения различных видов рака, например, рака, выбранного из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака и рака кожи.

[00202] Кроме того, рак может включать опухоль, состоящую из опухолевых клеток. Например, опухолевые клетки могут включать, но не ограничиваются этим, 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 тестикулярного рака, 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, но не ограничиваясь этим: фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, тестикулярная опухоль, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома,

акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

[00203] Режимы лечения также могут варьироваться и часто зависят от типа опухоли, ее расположения, прогрессирования заболевания, состояния здоровья и возраста пациента. Определенные типы опухолей могут требовать более агрессивных протоколов лечения, но в то же время пациенты могут быть неспособны переносить более агрессивные режимы лечения. Такие решения чаще всего принимает клиницист, основываясь на своих знаниях в данной области и известной эффективности и токсичности (если таковая имеется) терапевтических композиций.

[00204] Типичный курс лечения первичной опухоли или опухолевого очага после иссечения может включать несколько доз. Типичное лечение первичной опухоли может включать применение 6 доз в течение двухнедельного периода. Двухнедельная схема может быть повторена один, два, три, четыре, пять, шесть или более раз. Во время курса лечения необходимость завершения запланированной схемы введения может быть пересмотрена.

[00205] Иммунотерапия конъюгатом суперантигена часто приводит к быстрой (в течение нескольких часов) и мощной поликлональной активации Т-лимфоцитов. Цикл лечения конъюгатом суперантигена может включать от 4 до 5 ежедневных внутривенных инъекций конъюгата суперантигена. Такие циклы лечения можно осуществлять, 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 ответ Т-клеток быстро снижается (в течение 4-5 дней) до исходного уровня. Таким образом, период пролиферации лимфоцитов, в течение которого цитостатические лекарственные средства могут препятствовать лечению суперантигеном, является коротким и четко определенным.

[00206] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгат суперантигена, например, конъюгат суперантигена, рассматриваемый в настоящей заявке, 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 конъюгат суперантигена, например, конъюгат суперантигена, рассматриваемый в настоящей заявке, ежедневно в течение 4 дней подряд каждые 3-4 недели (например, 3 или 4 недели).

[00207] В некоторых вариантах осуществления схема лечения по настоящему изобретению может включать контактирование новообразования или опухолевых клеток с конъюгатом суперантигена и иммунной клеткой, например, CAR Т-клеткой, в одно и то же время. Это может быть достигнуто контактированием клетки с одной композицией или фармакологическим препаратом, включающим оба агента, или контактированием клетки с двумя различными композициями или препаратами одновременно, где одна композиция

включает конъюгат суперантигена, а другая включает иммунную клетку, например, CAR T-клетку.

[00208] Альтернативно, конъюгат суперантигена можно вводить до или после иммунной клетки, например, CAR T-клетки, с интервалами от нескольких минут до нескольких дней или недель. В вариантах осуществления, где иммунная клетка, например, CAR T-клетка, и конъюгат суперантигена доставляются в клетку отдельно, необходимо следить за тем, чтобы период времени между моментом каждой доставки не был значительным, чтобы конъюгат суперантигена и иммунная клетка, например, CAR T-клетка, еще могли полезным образом проявлять комбинированный эффект на клетку. В таких случаях предполагается, что можно осуществлять контактирование с клеткой с использованием обеих модальностей с промежутком не более приблизительно 12-72 часов между их введениями. Однако в некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период времени для лечения, когда перерыв между соответствующими введениями будет от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[00209] Можно использовать различные комбинации, где конъюгат суперантигена обозначен как "А", а иммунная клетка, *например*, CAR T-клетка, обозначена как "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.

[00210] Предполагается, что эффективное количество или доза иммунных клеток, например, CAR T-клеток, которые вводят в комбинации с конъюгатом суперантигена, представляет собой дозу, которая приводит к по меньшей мере аддитивному, но предпочтительно к синергетическому противоопухолевому эффекту и не мешает и не ингибирует усиление иммунной системы или активацию Т-клеток. Если иммунную клетку, например, CAR T-клетку, вводят одновременно с конъюгатом суперантигена, то иммунную клетку, например, CAR T-клетку, можно вводить в низкой дозе, чтобы она не вмешивалась в механизм действия конъюгата суперантигена.

[00211] Описанные в настоящей заявке способы и композиции можно использовать отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами и/или модальностями. Термин, вводимый «в комбинации», используемый в настоящей заявке, означает, что два (или более) разных лечения доставляются субъекту в течение периода поражения субъекта расстройством, чтобы оказываемые на пациента эффекты этих лечений перекрывались в определенный момент времени. В некоторых вариантах осуществления доставка одного лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго, чтобы таким образом существовало перекрытие, что касается введения. Это иногда указывается в настоящей заявке как «совместная» или «одновременная доставка». В других вариантах осуществления одно лечение заканчивается до того, как начинается другое лечение. В некоторых вариантах осуществления в любом случае лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе лечение является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при

меньшем количестве второго лечения, или второе лечение уменьшает симптомы в большей степени, чем если бы второе лечение вводили в отсутствие первого лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым лечением. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с расстройством, больше, чем то, которое наблюдалось бы при применении одного лечения в отсутствие другого. Эффект двух видов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть такой, что эффект первого доставленного лечения все еще можно обнаружить при доставке второго.

[00212] В некоторых вариантах осуществления способ или композицию, описанную в настоящей заявке, вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными методами лечения, например, хирургическим вмешательством, лучевой терапией или введением другого терапевтического препарата. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать химиотерапию, например, цитотоксическое средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать таргетную терапию, например, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор протеасомы или ингибитор протеазы. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать противовоспалительное, антиангиогенное, антифиброзное или антипролиферативное соединение, например, стероид, биологический иммуномодулятор, моноклональное антитело, фрагмент антитела, аптамер, миРНК, антисмысловую молекулу, слитый белок, цитокин, цитокиновый рецептор, бронходилататор, статин, противовоспалительное средство (например, метотрексат) или НСПВЛС. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать соединение, предназначенное для снижения у субъекта возможной иммунореактивности к вводимому конъюгату суперантигена. Например, иммунореактивность в отношении вводимого суперантигена может быть снижена путем совместного введения, например, с анти-CD20 антителом и/или анти-CD19 антителом, что снижает продукцию антител к суперантигену у субъекта. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать комбинацию терапевтических средств разных классов.

[00213] В некоторых вариантах осуществления способ или композицию, описанную в настоящей заявке, вводят в комбинации с иммунопотенциатором.

[00214] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные иммунопотенциаторы могут: (a) стимулировать активирующую Т-клеточную сигнализацию, (b) подавлять ингибирующую Т-клеточную сигнализацию между раковыми клетками и Т-клетками, (c) подавлять ингибирующую сигнализацию, которая приводит к Т-клеточной экспансии, активации и/или активности, посредством пути иммунного ответа, не связанного с IgG1 человека, например, пути, опосредованного иммуноглобулином IgG4 человека, (d) обеспечить комбинацию (a) и (b), (e) комбинацию (a) и (c), (f) комбинацию (b) и (c), и (g) комбинацию (a), (b) и (c).

[00215] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой ингибитор пути контрольной точки. Ингибитор контрольной точки может быть, например, выбран из антагониста PD-1, антагониста PD-L1, антагониста CTLA-4, антагониста аденозинового рецептора A2A, антагониста B7-H3, антагониста B7-H4, антагониста BTLA, антагониста KIR, антагониста LAG3, антагониста TIM-3, антагониста VISTA или антагониста TIGIT.

[00216] PD-1 представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности Т-клеток, который служит контрольной точкой иммунной системы, которая ингибирует или иным образом модулирует Т-клеточную активность в соответствующее время, чтобы предотвратить сверхактивный иммунный ответ. Раковые клетки, однако, могут воспользоваться этой контрольной точкой, экспрессируя лиганды, например, PD-L1, PD-L2 и т.д., которые взаимодействуют с PD-1 на поверхности Т-клеток для выключения или модуляции Т-клеточной активности. Используя этот подход, рак может избежать иммунного ответа, опосредованного Т-клетками.

[00217] В CTLA-4 пути взаимодействие CTLA-4 на Т-клетке с его лигандами (например, CD80, также известным как B7-1, и CD86) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (а не раковых клеток) приводит к ингибированию Т-клеток. В результате лиганд, который ингибирует Т-клеточную активацию или активность (например, CD80 или CD86), обеспечивается антигенпрезентирующей клеткой (ключевым типом клеток в иммунной системе), а не раковой клеткой. Хотя связывание CTLA-4 и PD-1 оказывает одинаковый негативный эффект на Т-клетки, время ингибирования, ответственные сигнальные механизмы и анатомические локализации иммунного ингибирования этими двумя иммунными контрольными точками различаются (*American Journal of Clinical Oncology*. Volume 39, Number 1, February 2016). В отличие от CTLA-4, который ограничивается ранней примиряющей фазой 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, неповторяющимися механизмами действия.

[00218] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор предотвращает (полностью или частично) подавление антигеном, экспрессируемым раковой клеткой, передачи Т-клетками ингибирующих сигналов между раковой клеткой и Т-клеткой. В одном варианте осуществления такой иммунопотенциатор представляет собой ингибитор контрольной точки, например, ингибитор на основе PD-1. Примеры таких иммунопотенциаторов включают, например, анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-PD-L2 антитела.

[00219] 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, чтобы предотвратить связывание PD-1 лиганда, 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 PD-1 лигандом (например, PD-L1 или PD-L2), чтобы предотвратить связывание PD-1 лиганда с его родственным PD-1 на Т-клетке.

[00220] В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена вводят с ингибитором CTLA-4, например, анти-CTLA-4 антителом. Иллюстративные анти-CTLA-4 антитела описаны в патентах США №№ 6984720, 6682736, 7311910; 7307064, 7109003, 7132281, 6207156, 7807797, 7824679, 8143379, 8263073, 8318916, 8017114, 8784815 и 8883984, международных (PCT) публикациях №№ WO98/42752, WO00/37504 и WO01/14424 и Европейском патенте 1212422 В1. Иллюстративные антитела к CTLA-4 включают ипилимумаб или тремелимумаб.

[00221] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор предотвращает (полностью или частично) подавление антигеном, экспрессируемым раковой клеткой, Т-клеточной экспансии, активации и/или активности посредством пути иммунного ответа, опосредованного IgG4 человека (не IgG1 человека), например, не через путь ADCC. Предполагается, что в таких вариантах осуществления, хотя иммунный ответ, потенцируемый конъюгатом суперантигена и иммунопотенциатором, может включать некоторую активность ADCC, основной компонент(компоненты) иммунного ответа не включает активность ADCC. Напротив, некоторые из антител, которые в настоящее время используются в иммунотерапии, такие как ипилимумаб (анти-CTLA-4 IgG1 моноклональное антитело), могут убивать клетки-мишени через ADCC путем передачи сигналов посредством их Fc-домена через Fc-рецепторы на эффекторных клетках. Ипилимумаб, как и многие другие терапевтические антитела, был разработан как человеческий иммуноглобулин IgG1, и, хотя ипилимумаб блокирует взаимодействия между CTLA-4 и CD80 или CD86, считается, что его механизм действия включает ADCC истощение инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни CTLA-4 на клеточной поверхности. (Mahoney et al. (2015) NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY 14: 561-584.) Учитывая, что CTLA-4 сильно экспрессируется на подмножестве Т-клеток (регуляторных Т-клеток), которые негативно регулируют активацию Т-клеток, когда вводят анти-CTLA-4 IgG1 антитело, количество регуляторных Т-клеток снижается посредством ADCC.

[00222] В некоторых вариантах осуществления желательно использовать иммунопотенциаторы, способ действия которых заключается, прежде всего, в блокировании ингибирующих сигналов между раковыми клетками и Т-клетками без значительного истощения популяций Т-клеток (например, позволяя Т-клеточным популяциям разрастаться). Для достижения этого желательно использовать антитело, например, анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело или анти-PD-L2 антитело, которое имеет изотип IgG4 человека или основано на нем. Изотип человеческого IgG4 предпочтителен при определенных обстоятельствах, поскольку этот изотип антител вызывает меньшую активность ADCC или не вызывает ее вообще по сравнению с изотипом человеческого IgG1 (Mahoney et al. (2015) выше). Соответственно, в некоторых

вариантах осуществления иммунопотенциатор, например, анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело или анти-PD-L2 антитело, имеет или основан на изоците IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, о котором известно, что оно не истощает Treg, например, IgG4 антитела, направленные на контрольные точки, отличные от CTLA-4 (например, ингибиторы анти-PD-1 IgG4).

[00223] В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, которое имеет или основано на изоците человеческого IgG1 или другом изоците, который вызывает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC). В других вариантах осуществления иммунопотенциатор представляет собой антитело, которое имеет или основано на изоците IgG4 человека или другом изоците, который вызывает незначительную или не вызывает никакой антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC).

[00224] Иллюстративные ингибиторы на основе PD-1 описаны в патентах США №№ 8728474, 8952136 и 9073994 и патенте EP № 1537878B1. Иллюстративные анти-PD-1 антитела описаны, например, в патентах США №№ 8952136, 8779105, 8008449, 8741295, 9205148, 9181342, 9102728, 9102727, 8952136, 8927697, 8900587, 8735553 и 7488802. Иллюстративные анти-PD-1 антитела включают ниволумаб (OPDIVO[®], Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (KEYTRUDA[®], Merck), цемиплимаб (LIBTAYO[®], Regeneron/Sanofi), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), пидилизумаб (CT-011), достарлимаб, синтилимаб, торипалимаб, камрелизумаб, тислелизумаб и пролголимаб. Иллюстративные анти-PD-L1 антитела описаны, например, в патентах США №№ 9273135, 7943743, 9175082, 8741295, 8552154 и 8217149. Иллюстративные анти-PD-L1 антитела включают авелумаб (BAVENCIO[®], EMD Serono/Pfizer), атезолизумаб (TECENTRIQ[®], Genentech) и дурвалумаб (IMFINZI[®], Medimmune/AstraZeneca).

[00225] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор на основе PD-1, *например, анти-PD-1 антитело, например, анти-PD-1 антитело*, рассматриваемое в настоящей заявке, раз в 1-5 недель (например, раз в 1, 2, 3, 4 или 5 недель). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор на основе PD-1, *например, анти-PD-1 антитело, например, анти-PD-1 антитело*, рассматриваемое в настоящей заявке, раз в 2-4 недели (например, раз в 2, 3 или 4 недели).

[00226] Ингибитор на основе PD-1 можно сконструировать, экспрессировать и очистить с использованием методов, известных специалистам в данной области, например, как описано выше. Анти-PD-1 антитела можно сконструировать, экспрессировать, очистить, сформулировать в композицию и вводить, как описано в патентах США №№ 8728474, 8952136 и 9073994.

[00227] Другие иммунопотенциаторы (например, антитела и различные малые молекулы) могут направленно действовать на сигнальные пути, включающие один или несколько из следующих лигандов: B7-H3 (обнаруживается, среди прочего, в клетках

предстательной железы, почечного эпителия, немелкоклеточных клетках легкого, поджелудочной железы, яичников, колоректальных клетках); В7-Н4 (обнаруживается, среди прочего, в клетках молочной железы, почечного эпителия, яичников, поджелудочной железы, клетках меланомы); HHLA2 (обнаруживается, среди прочего, в клетках молочной железы, легких, щитовидной железы, меланомы, поджелудочной железы, яичников, печени, мочевого пузыря, толстой кишки, предстательной железы, почек); галектины (обнаруживаются, среди прочего, в немелкоклеточных клетках легких, колоректальных клетках и клетках желудка); CD30 (обнаруживается, среди прочего, в клетках лимфомы Ходжкина, крупноклеточной лимфомы); CD70 (обнаруживается, среди прочего, в клетках неходжкинской лимфомы, клетках почечного эпителия и др.); ICOSL (обнаруживается, среди прочего, в клетках глиобластомы, меланомы); CD155 (обнаруживается, среди прочего, в клетках почек, предстательной железы, панкреатической глиобластомы); и TIM3. Подобным образом другие потенциальные иммунопотенциаторы, которые можно использовать, включают, например, агонист 4-1BB (CD137) (например, полностью человеческое IgG4 анти-CD137 антитело Урелумаб/BMS-663513), ингибитор LAG3 (например, гуманизированное IgG4 анти-LAG3 антитело LAG525, Novartis); ингибитор IDO (например, малая молекула INCB024360, Incyte Corporation), ингибитор TGF β (например, малая молекула Galunisertib, Eli Lilly) и другие рецепторы или лиганды, которые обнаруживаются на Т-клетках и/или опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления иммунопотенциаторы (например, антитела и различные малые молекулы), нацеленные на сигнальные пути, включающие один или несколько из вышеуказанных лигандов, подходят для фармацевтического вмешательства, основанного на взаимодействиях агонист/антагонист, но не посредством ADCC.

[00228] Кроме того, предполагается, что настоящее изобретение можно использовать в сочетании с хирургическим вмешательством. В случае хирургического вмешательства настоящее изобретение может быть использовано до операции, например, для того, чтобы сделать неоперабельную опухоль операбельной. Альтернативно, настоящее изобретение можно использовать во время операции и/или после нее для лечения остаточного или метастатического заболевания. Например, в ложе резецированной опухоли можно инъектировать или перфузировать препарат, включающий иммунные клетки и/или конъюгат суперантигена. Перфузию можно продолжить после резекции, например, оставив катетер имплантированным в месте операции. Также предусмотрено периодическое послеоперационное лечение. Любая комбинация терапии по изобретению с хирургией входит в объем изобретения.

[00229] Непрерывное введение также может применяться, когда это уместно, например, когда опухоль вырезают и ложе опухоли обрабатывают для устранения остаточного микроскопического заболевания. Доставка через шприц или прижигание являются предпочтительными. Таковую непрерывную перфузию можно осуществлять в течение периода от около 1-2 часов до около 2-6 часов, до около 6-12 часов, до около 12-

24 часов, до около 1-2 дней, до около 1-2 недель или дольше после начала лечения. Как правило, доза терапевтической композиции при непрерывной перфузии будет эквивалентна дозе, вводимой путем однократной или многократной инъекции, скорректированной в течение периода времени, в течение которого происходит перфузия. Кроме того, предполагается, что перфузию конечности можно использовать для введения терапевтических композиций по настоящему изобретению, особенно при лечении меланомы и саркомы.

[00230] Примеры цитотоксических средств, которые можно вводить в комбинации с описанным способом или композицией, включают, например, антимикротрубочковые средства, ингибиторы топоизомеразы, антиметаболиты, ингибиторы синтеза и деградации белка, ингибиторы митоза, алкилирующие средства, платинирующие средства, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, ингибиторы гистондеацетилазы (ингибиторы HDAC, например, вориносат (SAHA, MK0683), энтиносат (MS-275), панобиносат (LBH589), трихостатин А (TSA), моцетиносат (MGCD0103), белиносат (PXD101), ромидепсин (FK228, депсипептид)), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, азотистый иприт, нитрозомочевины, этиленимины, алкилсульфонаты, триазены, аналоги фолиевой кислоты, нуклеозидные аналоги, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, алкалоиды барвинка, таксаны, эпотилоны, интеркалирующие средства, средства, способные препятствовать пути сигнальной трансдукции, средства, которые промотируют апоптоз и облучение, или конъюгаты молекул антител, которые связывают поверхностные белки для доставки токсического средства. В одном варианте осуществления цитотоксическое средство, которое можно вводить с использованием способа или композиции, описанных в настоящей заявке, представляет собой средство на основе платины (такое как цисплатин), циклофосфамид, дакарбазин, метотрексат, фторурацил, гемцитабин, капецитабин, гидроксимочевину, топотекан, иринотекан, азацитидин, вориносат, иксабепилон, бортезомиб, таксаны (например, паклитаксел или доцетаксел), цитохалазин В, грамицид D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, винорелбин, колхицин, антрациклины (например, доксорубицин или эпирубицин) даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, адриамицин, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, ризин или майтансиноиды.

VII. Наборы

[00231] Кроме того, изобретение обеспечивает наборы, включающие, например, первый контейнер, содержащий конъюгат суперантигена, и второй контейнер, содержащий иммунную клетку. Такой набор может также содержать дополнительные агенты, такие как, например, кортикостероид или другой модулятор липидов. Контейнеры как таковые могут представлять собой шприц, пипетку и/или другое подобное устройство, из которого препарат можно наносить на конкретный участок тела, вводить животному и/или наносить и/или смешивать с другими компонентами набора.

[00232] Наборы могут включать подходящие аликвоты конъюгата суперантигена и/или иммунных клеток и, необязательно, композиции липидов и/или дополнительных агентов по настоящему изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованы как в водной среде, так и в лиофилизированной форме. Когда компоненты набора предоставляются в виде одного и/или нескольких жидких растворов, жидкий раствор представляет собой стерильный водный раствор.

ПРИМЕРЫ

[00233] Следующие Примеры являются просто иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или содержания настоящего изобретения каким-либо образом.

Пример 1

[00234] В этом примере описывается исследование *in vitro*, в котором испытывали противораковый эффект направленного против опухоли конъюгата суперантигена наптумомаба эстафенатокса (NAP) в комбинации с CAR T-клетками против клеточной линии рака головы и шеи FaDu.

[00235] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли у здоровых доноров. PBMC включают T-клетки и клетки, содержащие главный комплекс гистосовместимости (MHC) класса II (например, моноциты). PBMC инкубировали в течение 4 дней с (i) 10 мкг/мл NAP и 20 единиц/мл IL-2, или (ii) с антителами против CD3 и CD28 и 20 единиц/мл IL-2. Затем CD8⁺ T-клетки выделяли и дополнительно модифицировали для экспрессии CAR, который имеет (i) внеклеточную часть, включающую вариабельные домены тяжелой и легкой цепи моноклонального анти-Her2 антитела и шарнир, (ii) трансмембранный домен, (iii) внутриклеточную часть, включающую сигнальный домен, полученный из CD3z, и костимулирующую последовательность, полученную из 41BB, и (iv) тус метку для детекции. Для экспрессии CAR нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, была клонирована в pGEM4z, что позволило получить CAR-кодирующую мРНК посредством транскрипции *in vitro*. 0,25 мкг мРНК, кодирующей либо Her2 CAR, либо CAR отрицательного контроля (без scFV), электропорировали в CD8⁺ T-клетки для экспрессии в течение максимум 48 часов.

[00236] Раковые клетки FaDu, экспрессирующие как антиген, на который нацелен CAR (Her2), так и антиген, на который нацелен NAP (5T4), инкубировали с CD8⁺ T-клетками в течение 4 часов. Отношение эффектор:мишень (T-клетки:клетки FaDu) составляло 5. Где указано, в анализ добавляли 0,1 нг/мл NAP. В конце обработки культуральный супернатант удаляли, включая суспендированные T-клетки, а жизнеспособность раковых клеток тестировали с использованием набора ССК-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma Aldrich) в соответствии с протоколом изготовителя. Жизнеспособность контрольной группы (без T-клеток) нормализовали до 100%. Выживаемость раковых клеток (%)=(значение OD в группе обработки/значение OD в контрольной группе) × 100.

[00237] Как показано на Фиг. 4, Her2 CAR T-клетки отдельно (выращенные в присутствии CD3 и CD28) не оказывали существенного эффекта на жизнеспособность раковых клеток FaDu. Хотя включение NAP в анализ с T-клетками (выращенными в присутствии NAP) снижало жизнеспособность опухолевых клеток на 30% по сравнению с контролем ($p=0,0007$), комбинация CAR T-клеток (выращенных в присутствии NAP) и 0,1 мкг/мл NAP имела наиболее сильный эффект, приводя к снижению жизнеспособности раковых клеток на 75% ($p < 0,0001$ по сравнению со всеми испытываемыми группами). Эти результаты демонстрируют, что введение CAR T-клеток в комбинации с нацеленным на опухоль суперантигеном NAP, может приводить к усиленному противораковому эффекту, превышающему аддитивный эффект каждого агента при введении по отдельности.

Пример 2

[00238] В этом примере описывается исследование, в котором испытывали эффект NAP-стимуляции на CAR T-клеточную активность.

[00239] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли у здоровых доноров. PBMC включают T-клетки и клетки, содержащие главный комплекс гистосовместимости (MHC) класса II (например, моноциты). PBMC инкубировали либо (i) с NAP (1 или 10 мкг/мл) и IL-2 (20 единиц/мл), (ii) с антителами против CD3 и CD28 и IL-2 (20 единиц/мл), либо (iii) с антителом против CD3 и высокой дозой IL-2 (300 единиц/мл). После 4 дней стимуляции CD8⁺ T-клетки выделяли и оставляли на ночь, а затем индуцировали для экспрессии CAR конструкций путем электропорации с 1 мкг мРНК Her2 CAR, как описано в Примере 2. В день исследования экспрессию CAR конструкций количественно оценивали методом проточной цитометрии, и было обнаружено, что она одинакова для всех методов активации (Фиг. 5). Экспрессию TRBV7-9 измеряли методом FACS с использованием мультимера фикоэритрин(PE)-меченного NAP. Результаты показали, что процент TRBV7-9 CD8⁺ T-клеток увеличился 10-кратно после NAP-активации по сравнению с CD3/CD28-стимуляцией (Фиг. 6).

[00240] Для оценки активности CAR T-клеток Her2-экспрессирующие раковые клетки FaDu инкубировали в течение 4 часов с активированными Her2 CAR T-клетками. В этом анализе NAP не добавляли. Соотношение эффектор:мишень (T-клетки:опухолевые клетки) составляло 5:1. В конце лечения жизнеспособность раковых клеток FaDu определяли с использованием набора ССК8, как описано в Примере 2.

[00241] Хотя NAP-стимуляция не влияла на экспрессию CAR, NAP-стимуляция значительно увеличивала активность CAR T-клеток против раковых клеток FaDu. CD3/CD28-стимулированные CAR T-клетки снижали жизнеспособность раковых клеток примерно на 35%, тогда как NAP-стимулированные CAR T-клетки снижали жизнеспособность раковых клеток более чем на 70% ($p<0,0001$; Фиг. 7). Кроме того, больший процент NAP-стимулированных CAR T-клеток, чем CD3/CD28-стимулированных CAR T-клеток, экспрессировал INF γ и маркер дегрануляции CD107a, которые являются индикаторами повышенной активности T-клеток (Фиг. 8).

Удивительно, но даже несмотря на то, что NAP не присутствовал в испытанных экспериментальных условиях, предшествующая NAP-стимуляция увеличивала активность CAR T-клеток.

[00242] Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что NAP-активация значительно повышает активность CAR T-клеток, и указывают на то, что NAP-стимуляция может быть улучшением по сравнению со стандартными методами, включая индуцированную CD3/CD28 *in vitro* активацию и экспансию T-клеток (например, CAR T-клеток), перед введением пациентам.

Пример 3

[00243] В этом примере описывается *in vitro* исследование, в котором сравнивали противораковый эффект CAR T-клеток в комбинации с либо NAP, либо неконъюгированным суперантигеном стафилококкового энтеротоксина (SEA), против клеточной линии опухоли головы и шеи FaDu.

[00244] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли у здоровых доноров. PBMC включают T-клетки и клетки, содержащие главный комплекс гистосовместимости (MHC) класса II (например, моноциты). PBMC инкубировали либо (i) с NAP (10 мкг/мл) и IL-2 (20 единиц/мл), (ii) с SEA (10 нг/мл) и IL-2 (20 единиц/мл), либо (iii) с антителами против CD3 и CD28 и IL-2 (20 единиц/мл). После 4 дней стимуляции CD8⁺ T-клетки выделяли и оставляли на ночь, а затем индуцировали для экспрессии CAR конструкций путем электропорации с 9,167 мкг мРНК Her2 CAR, как описано в Примерах 1 и 2.

[00245] Раковые клетки FaDu, экспрессирующие как антиген, на который нацелен CAR (Her2), так и антиген, на который нацелен NAP (5T4), инкубировали с CD8⁺ T-клетками в течение 4 часов. Отношение эффектор:мишень (T-клетки:клетки FaDu) составляло 5. Где указано, в анализ добавляли 0,01 нг/мл NAP или 0,01 нг/мл SEA. В конце обработки жизнеспособность раковых клеток FaDu определяли с использованием набора ССК-8, как описано в Примере 1. Жизнеспособность контрольной группы (отсутствие T-клеток) нормализовали до 100%. Результаты показаны на **Фиг. 9**.

[00246] Комбинация SEA и CAR T-клеток (выращенных в присутствии SEA) была неэффективна против клеток FaDu. CAR T-клетки, выращенные в присутствии антител против CD3 и CD28, также были неэффективны. Напротив, комбинация NAP и CAR T-клеток (выращенных в присутствии NAP) снижала жизнеспособность клеток FaDu на 76,2% ($p < 0,0001$; Фиг. 9). Эти результаты демонстрируют, что комбинация CAR T-клеток и конъюгата суперантигена NAP имеет значительный противораковый эффект по сравнению с комбинацией CAR T-клеток и неконъюгированного суперантигена SEA.

Включение посредством ссылки

[00247] Полное раскрытие каждого из патентов и научных документов, на которые делается ссылка в настоящей заявке, включено посредством ссылки для всех целей.

Эквиваленты

Изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отступления от его сути или существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления во всех отношениях следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящей заявке. Таким образом, объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и предполагается, что все изменения, подпадающие под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, охватываются ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества иммунной клетки, включающей экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

2. Способ по п. 2, где суперантиген включает стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

3. Способ по любому из пп. 1-3, где суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где нацеливающий фрагмент представляет собой антитело.

5. Способ по п. 4, где антитело представляет собой анти-5T4 антитело.

6. Способ по п. 5, где анти-5T4 антитело включает Fab-фрагмент, который связывает раковый антиген 5T4.

7. Способ по п. 6, где анти-5T4 антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-458 SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, включающую аминокислотные остатки 1-214 SEQ ID NO: 9.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где конъюгат суперантигена включает первую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, включающую SEQ ID NO: 9.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где иммунная клетка выбрана из Т-клетки, натуральной киллерной клетки (NK) и натуральной киллерной Т-клетки (NKT).

10. Способ по п. 9, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

11. Способ по п. 10, где Т-клетка включает Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

12. Способ по п. 11, где первый и/или второй раковый антиген выбраны из 5T4, мезотелина, простатспецифического мембранного антигена (PSMA), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), карбоангидразы IX (CAIX), карциноэмбрионального антигена (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD47, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиального гликопротеина 2 (EGP 2), эпителиального гликопротеина-40 (EGP-40), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), фолат-связывающего белка (FBP), фетального ацетилхолинового рецептора (AChR), фолатного рецептора- α и β (FR α и β), ганглиозида G2 (GD2), ганглиозида G3 (GD3), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER-2/ERB2), рецептора

эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII), ERB3, ERB4, обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), альфа-2 субъединицы рецептора интерлейкина 13 (IL-13Ra2), К-легкой цепи, рецептора домена вставки киназы (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), молекулы клеточной адгезии L1 (L1CAM), ассоциированного с меланомой антигена 1 (семейство меланомных антигенов A1, MAGE-A1), муцина 16 (MUC-16), муцина 1 (MUC-1), лигандов KG2D, раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1, опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), фактора роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белка опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранной рецепторной протеинтирозинкиназы 1 типа (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфат протеогликана-4 (CSPG4), вспомогательной молекулы DNAX (DNAM-1), рецептора 2 эфрина типа А (EfNA2), ассоциированного с фибробластами белка (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикана 3 (GPC3), HA-ИИ, HERK-V, IL-1 IRa, латентного мембранного белка 1 (LMP1), молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56), лиганда 1 рецептора запрограммированной гибели клеток (PD-L1), В-клеточного антигена созревания (BCMA) и Trail рецептора (TRAIL R).

13. Способ по п. 12, где первый и/или второй раковый антиген выбраны из 5T4, EpCAM, HER2, EGFRviii и IL13Ra2.

14. Способ по п. 13, где первый раковый антиген представляет собой 5T4.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где конъюгат суперантигена и иммунную клетку вводят отдельно или в комбинации.

16. Способ по п. 15, где конъюгат суперантигена и иммунную клетку вводят одновременно.

17. Способ по п. 15, где конъюгат суперантигена и иммунную клетку вводят в разное время.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора на основе PD-1.

19. Способ по п. 18, где ингибитор на основе PD-1 представляет собой ингибитор PD-1 или PD-L1.

20. Способ по п. 19, где ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело.

21. Способ по п. 20, где анти-PD-1 антитело выбрано из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба.

22. Способ по п. 19, где ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело.

23. Способ по п. 22, где анти-PD-L1 антитело выбрано из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где субъект представляет собой человека.

25. Фармацевтическая композиция, включающая: (i) конъюгат суперантигена, включающий суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; (ii) иммунную клетку, включающую экзогенную нуклеотидную

последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает второй раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

26. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 25.

27. Способ размножения Т-клеток, включающих Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9, при этом способ включает контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

28. Способ получения Т-клетки для применения в лечении субъекта, при этом способ включает контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

29. Способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает:

а) контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II; и

б) модификацию Т-клеток для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

30. Способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает:

а) модификацию Т-клеток для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR); и

б) контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

31. Способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает модификацию Т-клеток для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), при этом Т-клетки подвергались контактированию с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II.

32. Способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает контактирование Т-клеток с (i) суперантигеном, включающим стафилококковый энтеротоксин А или его иммунологически реактивный вариант и/или

фрагмент, и (ii) клеткой, включающей главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II, при этом Т-клетки были модифицированы для включения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

33. Способ по любому из пп. 27-32, где суперантиген включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее иммунологически реактивный вариант и/или фрагмент.

34. Способ по любому из пп. 27-33, где клетка, включающая МНС класса II, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC).

35. Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 27, 28, 33 или 34.

36. CAR Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 29-34.

37. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества Т-клетки по п. 35 или CAR Т-клетки по п. 36.

38. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества Т-клетки по п. 35 или CAR Т-клетки по п. 36.

39. Способ по п. 38, где способ не включает введение субъекту эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта.

40. Фармацевтическая композиция, включающая Т-клетки, где по меньшей мере 10% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, где по меньшей мере 20% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

42. Фармацевтическая композиция по п. 41, где по меньшей мере 30% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

43. Фармацевтическая композиция по п. 42, где по меньшей мере 40% Т-клеток включают Т-клеточный рецептор, включающий TRBV7-9.

44. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 40-43.

45. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 40-43.

46. Т-клетка, модифицированная, чтобы иметь повышенную экспрессию TRBV7-9 по сравнению с Т-клеткой, которая не была модифицирована.

47. Т-клетка по п. 46, где Т-клетка включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую TRBV7-9.

48. Т-клетка по п. 47, где Т-клетка дополнительно включает экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

49. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту: (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, включающего суперантиген, ковалентно связанный с нацеливающим фрагментом, который связывает первый раковый антиген, экспрессируемый раковыми клетками в организме субъекта; и (ii) эффективного количества Т-клетки по любому из пп. 46-48.

50. Способ по любому из пп. 1-24, 26, 37-39, 44, 45 и 49, где рак выбирают из рака, экспрессирующего 5T4, мезотелин, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), карбоангидразу IX (CAIX), карцино-эмбриональный антиген (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD47, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиальный гликопротеин 2 (EGP 2), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), фолат-связывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор (AChR), фолатный рецептор- α и β (FR α и β), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид G3 (GD3), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER-2/ERB2), рецептор эпидермального фактора роста ν III (EGFR ν III), ERB3, ERB4, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), альфа-2 субъединицу рецептора интерлейкина 13 (IL-13R α 2), К-легкую цепь, рецептор домена вставки киназы (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), молекулу клеточной адгезии L1 (L1CAM), ассоциированный с меланомой антиген 1 (семейство меланомных антигенов A1, MAGE-A1), муцин 16 (MUC-16), муцин 1 (MUC-1), лиганды KG2D, раково-тестикулярный антиген NY-ESO-1, опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), фактор роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белок опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранную рецепторную протеинтирозинкиназу 1 типа (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфат протеогликан-4 (CSPG4), вспомогательную молекулу DNAX (DNAM-1), рецептор 2 эфрина типа А (EphA2), ассоциированный с фибробластами белок (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикан 3 (GPC3), HA-III, HERK-V, IL-1 IR α , латентный мембранный белок 1 (LMP1), молекулу адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56), лиганд 1 рецептора запрограммированной гибели клеток (PD-L1), В-клеточный антиген созревания (BCMA) и Trail-рецептор (TRAIL R).

51. Способ по п. 50, где рак выбирают из рака, экспрессирующего 5T4, EpcAM, HER2, EGFR ν iii и IL13R α 2.

52. Способ по п. 51, где рак представляет собой 5T4-экспрессирующий рак.

53. Способ по любому из пп. 1-24, 26, 37, 42 и 46-49, где рак включает солидную

опухоль.

54. Способ по любому из пп. 1-24, 26, 37-39, 44, 45 и 49-53, где рак выбирают из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака и рака кожи.

SEQ ID NO: 3 SEA/E-120
SEQ ID NO: 10 SEA/E-18
SEQ ID NO: 1 SEE
SEQ ID NO: 2 SEA

A B

SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYYNKAITSSSEKSADQFLTNTLLFKGFFTG 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQRNALSNLRQIYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60
SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTG 60
*****:*.**:*:*****.* * .:.* ** ** :*:*****.

C

SEA/E-120 HPWYNLLVLDLGSTAATSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT 120
SEA/E-18 HPWYNLLVLDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT 120
SEE HPWYNLLVLDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT 120
SEA HSWYNLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT 120
* .*****:.* . .:.*.*****

SEA/E-120 EEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
SEA/E-18 EEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
SEE EEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
SEA EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKKNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFDGKVQ 180
*****:***.***::.***.**:*****:***: *:.***** *.****

D E

SEA/E-120 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDNTTISSTSLSISLYLYTT 233
SEA/E-18 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDNKTINSENHIALYLYTT 233
SEE RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDNKTINSENHIDLYLYTT 233
SEA RGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQQYSNTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLYTS 233
*****:* .:*.****.*****:*****.***.* .: * :****:

вариабельная область тяжелой цепи 5T4

SEQ ID NO: 7 1-50 EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYMH WVKQS PGKGL EWIGR
51-100 INPNN GVTLY NQKFK DKATL TVDKS STTAY MELRS LTSED SAVYY CARST
101-150 MITNY VMDYW GQGTS VTVSS AKTTP PSVYP LAFGS AAQTN SMVTL GCLVK
151-200 GYFPE PVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PSSTW PSETV
201-250 TCNVA HPASS TKVDK KIVPR DSGGP SEKSE EINEK DLRKK SELQG TALGN
251-300 LKQIY YYNSK AITSS EKSAD QELTN TLLFK GFTTG HEWYN DLLVD LGSTA
301-350 ATSEY EGSSV BLYGA YGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VFLHD NNRLT EEKKV
351-400 PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF
401-450 GGVQ RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD AQQQY PDLIL RIYRD NTTIS STSLI
451-458 ISLYL YTT

константная область тяжелой цепи C242

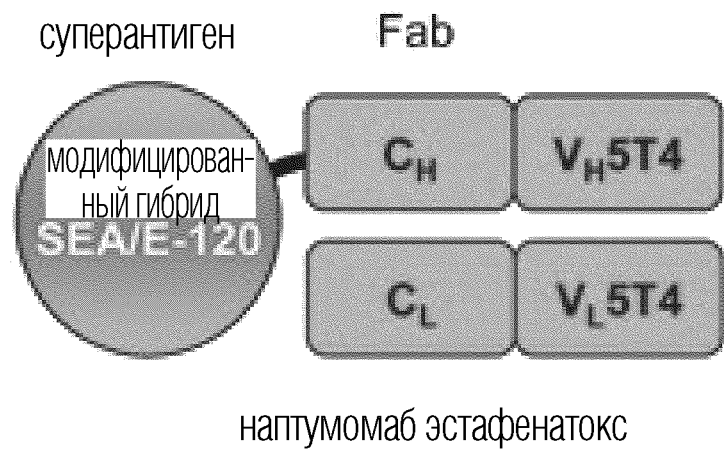
SEA/E-120

вариабельная область легкой цепи 5T4

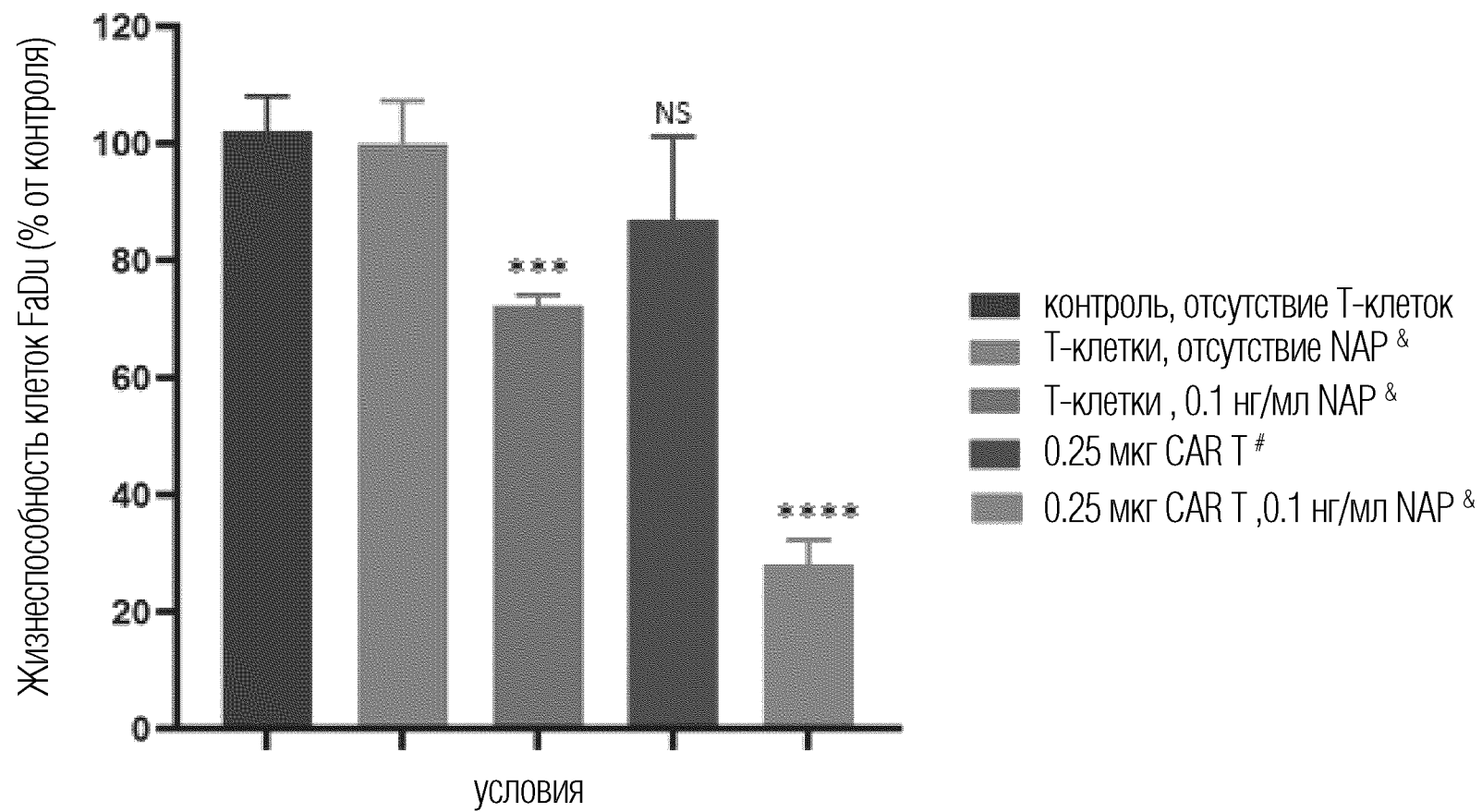
459-500 SI VMTQT PLSL VSACD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ
501-550 SPKLL ISYTS SRYAG VPDFR SGGY GTDFT LTISS VQAEI AAVYF CQDQY
551-600 NSPPT FGGGT KLEIK RADAA PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFLN NFYPK
601-650 DINVK WKIDG SERQN GVLNS WTDQD SKDST YSMSS TLFLT KDEYE RHNSY
651-672 TCEAT HKTST SPIVK SENRN ES

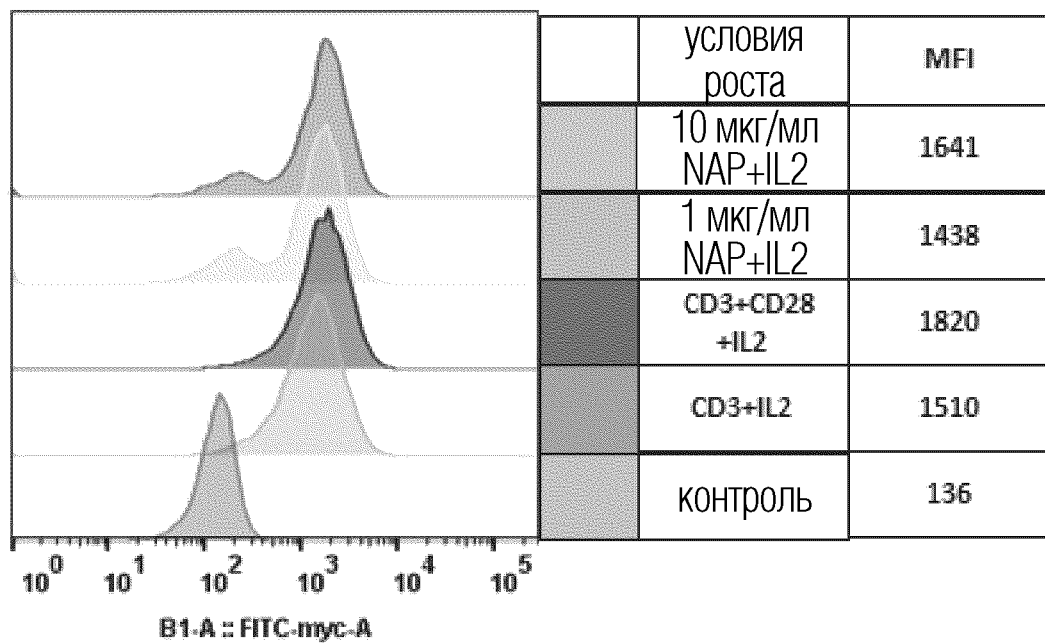
константная область легкой цепи C242

ФИГ. 2

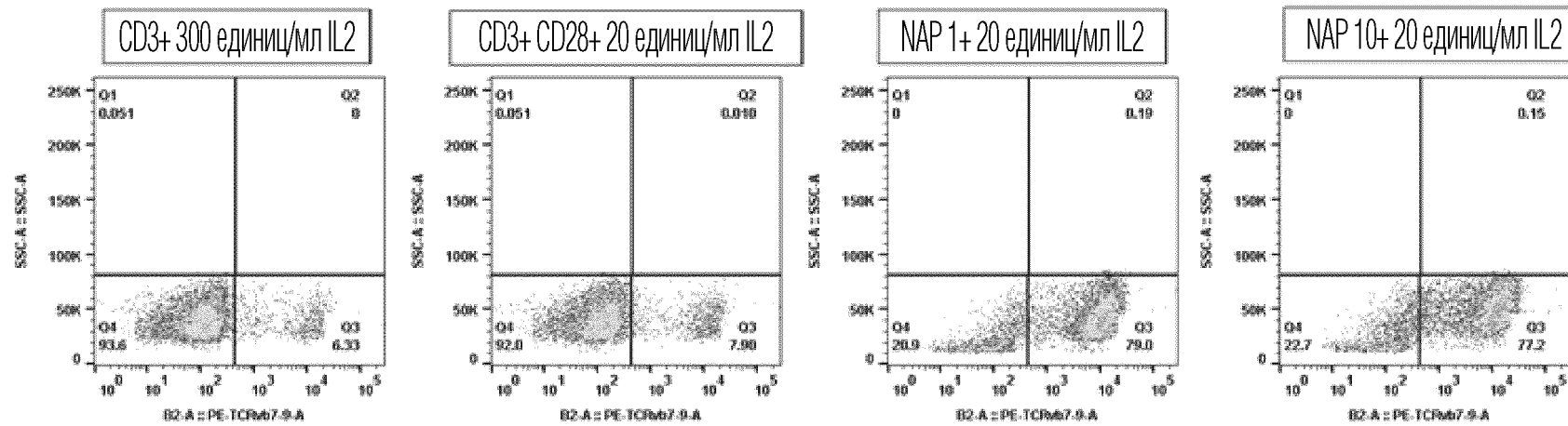


ФИГ. 3

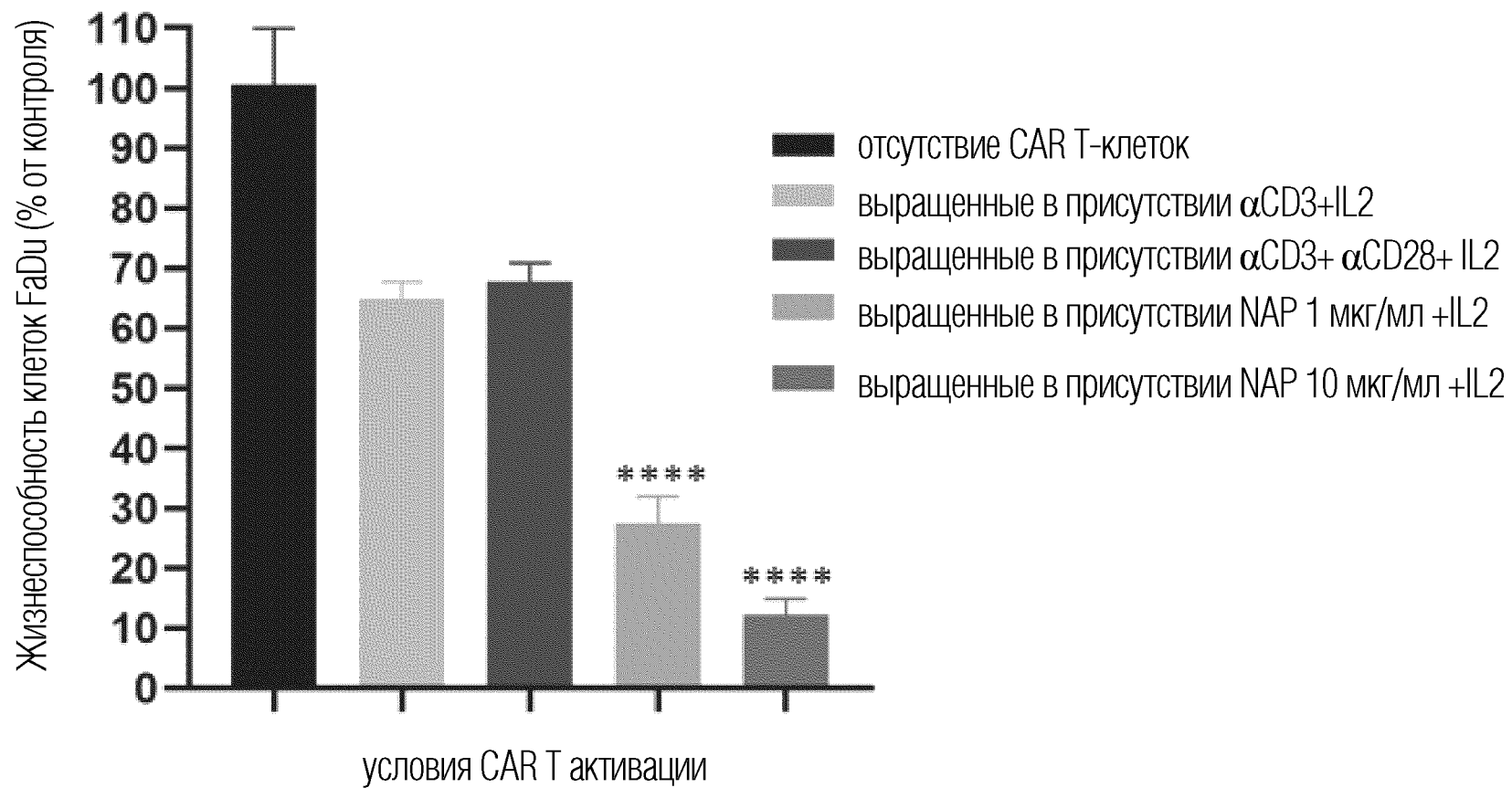




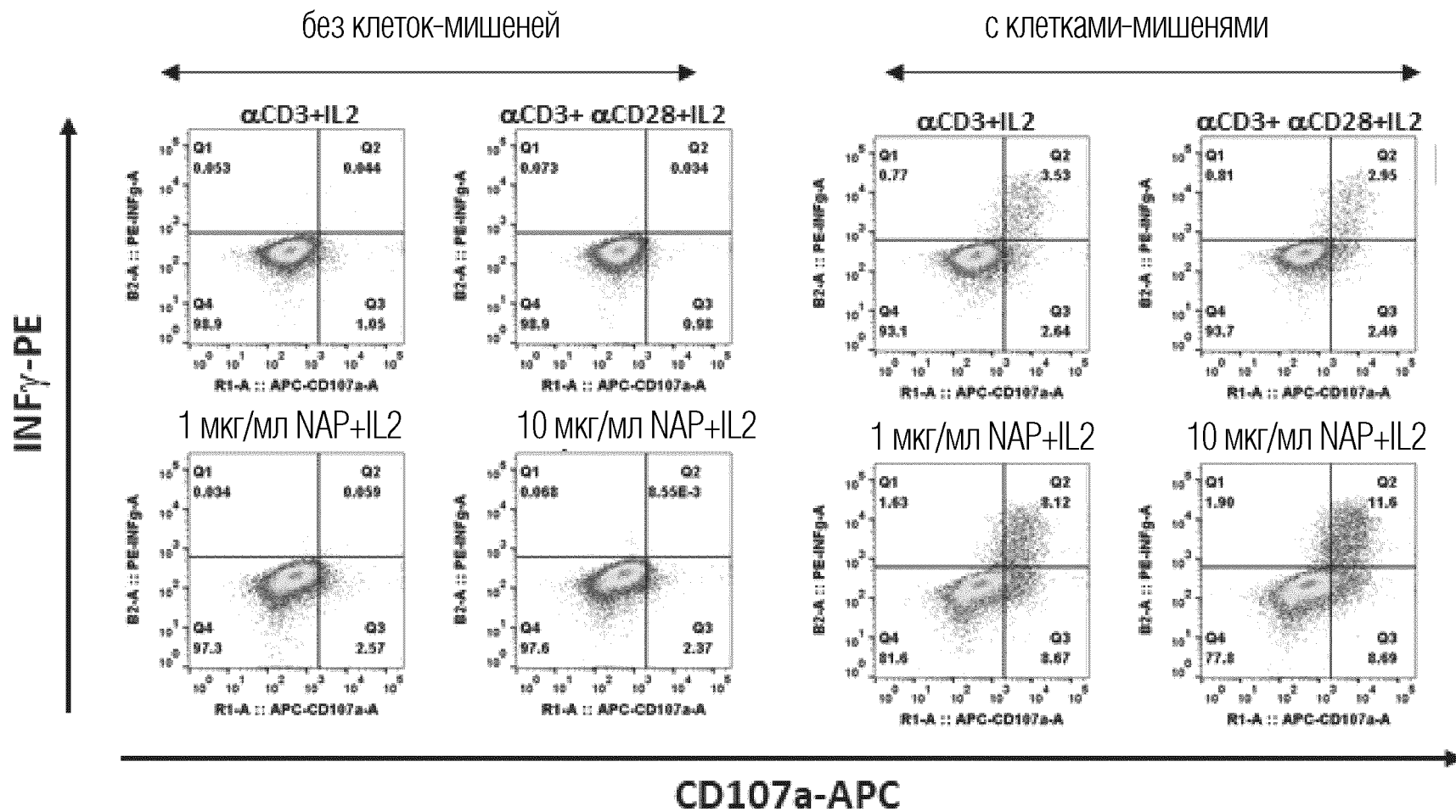
ФИГ. 5



ФИГ. 6

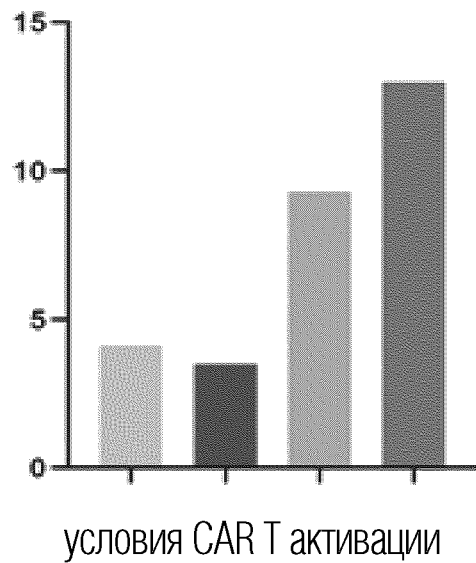


ФИГ. 7

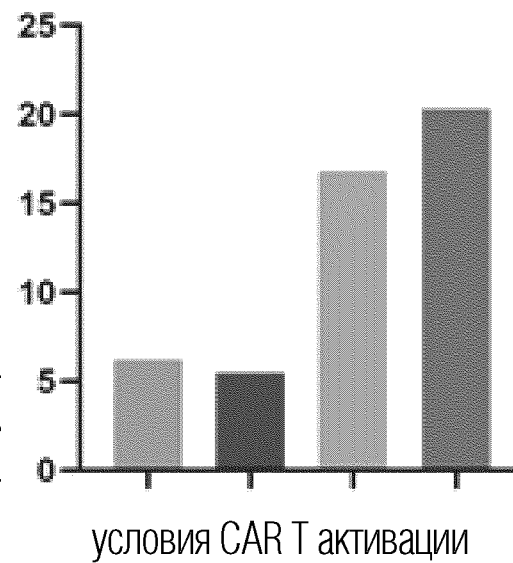


ФИГ. 8А

CAR T-клетки, экспрессирующие INF γ (%)

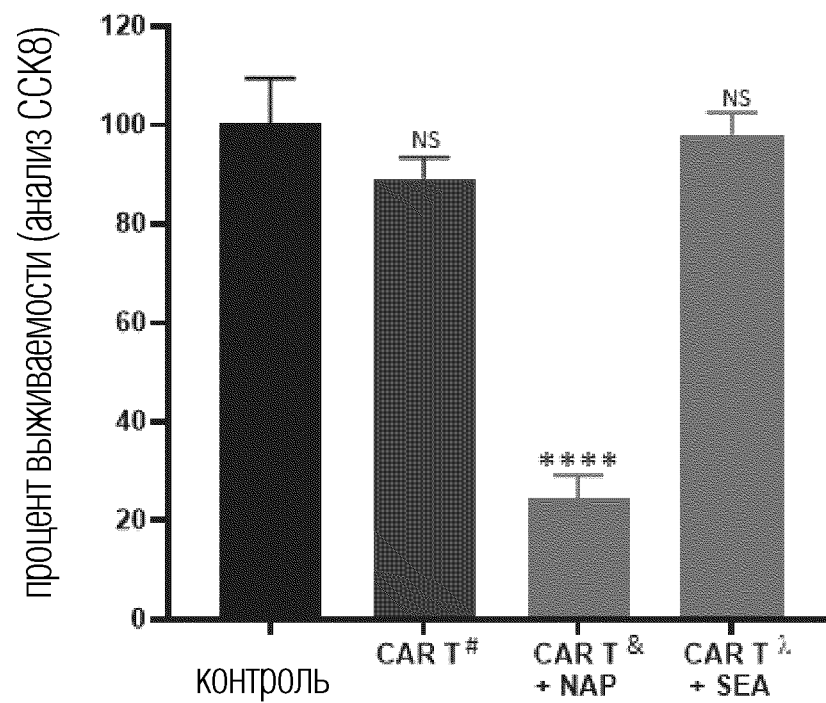


дегранулированные CAR T-клетки (%)



- выращенные в присутствии α CD3+IL2
- выращенные в присутствии α CD3+ α CD28+ IL2
- выращенные в присутствии NAP 1 мкг/мл +IL2
- выращенные в присутствии NAP 10 мкг/мл +IL2

ФИГ. 8В



ФИГ. 9