

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045360**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.11.20**

**(21)** Номер заявки  
**201891601**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.01.10**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/085** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ, УСИЛИВАЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
ОПОСРЕДОВАННОЙ СУПЕРАНТИГЕНОМ ИММУНОТЕРАПИИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

**(31)** 62/276,955

**(32)** 2016.01.10

**(33)** US

**(43)** 2019.03.29

**(86)** PCT/IB2017/000511

**(87)** WO 2017/122098 2017.07.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НЕОТКС ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (IL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Натан Ашер, Шахар Михал (IL)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2008156712  
MONDAL TAPAN K ET AL: "Synergistic immunopotentiating effects induced by T-cell and B-cell superantigen in mice", IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS, INFORMA HEALTHCARE, US, vol. 30, no. 3, 31 July 2001 (2001-07-31), pages 169-180, XP009500036, ISSN: 0882-0139, DOI:10.1081/IMM-100105062 [retrieved on 2009-07-07] page 169 page 170, paragraph 4 page 176, paragraph 1 - paragraph 2

DATABASE WPI Week 199742 Thomson Scientific, London, GB; AN 1997-453960 XP002771594, & JP H09 208491 A (ASAHI

OPTICAL CO LTD) 12 August 1997 (1997-08-12) abstract

S SI ET AL: "Gene therapy by membrane-expressed superantigen for [alpha]-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma", GENE THERAPY, vol. 13, no. 22, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 1603-1610, XP55017489, ISSN: 0969-7128, DOI:10.1038/sj.gt.3302823 page 1603, column 2, paragraph 1

WO-A2-2006015882

WO-A1-2016079050

FRANCESCO F. FAGNONI ET AL: "T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence", IMMUNOLOGY, vol. 106, no. 1, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 27-37, XP055386443, GB ISSN: 0019-2805, DOI:10.1046/j.1365-2567.2002.01400.x abstract

KRAFT S C ET AL: "Staphylococcal protein A bound to Sepharose 4B is mitogenic for T cells but not B cells from rabbit tissues", CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 37, no. 1, 1 October 1985 (1985-10-01), pages 13-21, XP026224619, ISSN: 0090-1229, DOI:10.1016/0090-1229(85)90130-8 [retrieved on 1985-10-01] abstract

**(57)** Изобретение относится к способам или композициям для усиления активности направленной на злокачественную опухоль иммунотерапии у пациента с использованием суперантигена в комбинации с иммуностимулятором (например, ингибитором PD-1).

**B1**

**045360**

**045360**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/276955, поданной 10 января 2016 года, полное содержание которой, таким образом, полностью включено посредством ссылки.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Изобретение в основном относится к способам и композициям для повышения активности опосредованной суперантигеном иммунотерапии злокачественных опухолей, и более конкретно относится к опосредованной суперантигеном иммунотерапии злокачественных опухолей иммуностимулятором, который предотвращает ускользание злокачественных клеток от иммунной системы индивидуума.

### **Предшествующий уровень техники**

Согласно Американскому обществу борьбы с раковыми заболеваниями каждый год в Соединенных Штатах Америки у более одного миллиона человек диагностируют злокачественную опухоль. Злокачественная опухоль представляет собой заболевание, которое является результатом неконтролируемой пролиферации клеток, которые когда-то подвергались естественным механизмам контроля, но трансформировались в злокачественные клетки, которые продолжают пролиферировать неконтролируемым образом. В последние годы было разработано несколько видов иммунотерапии, в которых пытались использовать иммунную систему индивидуума для поиска и разрушения злокачественных клеток. Такие виды иммунотерапии включают, например, виды иммунотерапии, которые направлены на усиление естественных защитных механизмов организма для борьбы со злокачественной опухолью, с использованием природных молекул, образующихся в организме, или, альтернативно, путем введения рекомбинантных молекул, сконструированных так, чтобы улучшать, лучше направлять или восстанавливать функцию иммунной системы.

Определенные виды иммунотерапии предусматривают введение соединений, которые, как известно, являются основными антагонистами иммунной системы, таких как цитокины, например, IL-2 и интерферон. Несмотря на то, что разработанные к настоящему времени различные виды иммунотерапии показали эффективность, они могут быть связаны с побочными эффектами, включая, например, ненаправленные виды активности, аллергические реакции на вводимые активные средства, включая возможность цитокиновых штормов, потерю активности вследствие стимуляции антителами, которые связывают и нейтрализуют активные средства, уменьшение количества клеток крови и усталость.

В других видах иммунотерапии используют молекулы, называемые ингибиторами иммунных контрольных точек, которые усиливают иммунные ответы на злокачественную опухоль. Такие ингибиторы контрольных точек действуют путем ингибирования способности злокачественных клеток блокировать ингибиторы иммунных контрольных точек, что таким образом приводит к повышению активности терапии против злокачественной опухоли. Ингибитор иммунных контрольных точек первого поколения ипилимумаб (YERVOY®; Bristol-Myers Squibb) был одобрен Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США в 2011 году и представляет собой моноклональное антитело IgG1, которое может использовать опосредованную ADCC цитотоксичность регуляторных T-клеток (Treg). На протяжении многих лет иммунохимиотерапия, сочетание иммунотерапии и химиотерапии, стала важной в лечении определенных злокачественных опухолей. Например, ритуксимаб (RITUXAN®; Roche) представляет собой специфическое к CD-20 моноклональное антитело, которое истощает экспрессирующие CD20 клетки, и стал стандартным компонентом лечения B-клеточных лимфом, например, неходжкинской лимфомы, с использованием ритуксимаба (R), циклофосфида (C), гидроксидоанурубидина (H), онковина (O) и преднизона (P), известного как R-CHOP.

Недавно были апробированы ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб и пембролизумаб, которые препятствуют ингибирующим сигналам между PD-1 и PD-L1. Несмотря на то, что эти лекарственные средства вызывают усиленные длительные реакции у некоторых пациентов, частоты реакций таких лекарственных средств в качестве монотерапии являлись низкими и находились в диапазоне 21%, и в некоторых исследованиях показатель полного ответа составлял приблизительно 1%.

Несмотря на то, что постоянно предпринимаются попытки объединить различные виды терапии против злокачественных опухолей для улучшения результатов лечения пациентов, и для некоторых комбинаций были продемонстрированы преимущества в отношении эффективности, вопросы безопасности стали вызывать серьезное беспокойство, т.к. комбинированные лекарственные средства могут усиливать серьезные побочные эффекты. Например, сообщалось о связанных с лекарственным средством неблагоприятных побочных явлениях 3 или 4 степени у значительного числа пациентов, которые получали антитела к CTLA-4 и антитело к PD1 в комбинации, по сравнению с пациентами, которые получали только антитело к CTLA-4. Таким образом, несмотря на существенное развитие, которое произошло в областях иммунотерапии и онкологии, все еще существует потребность в безопасных и эффективных видах иммунотерапии для лечения злокачественной опухоли.

### **Сущность изобретения**

В последние годы были разработаны различные виды иммунотерапии, которые в которых пытались использовать иммунную систему индивидуума для поиска и разрушения злокачественных клеток. Не-

смотря на то, что иммунная система человека обладает возможностью уничтожать злокачественные клетки, определенные злокачественные клетки выработали способность "выключать", "подавлять" или иным образом избегать иммунной системы хозяина, позволяющую злокачественным клеткам продолжать неконтролируемо расти и пролиферировать.

Изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против злокачественной опухоли у индивидуума можно значительно усиливать комбинацией терапии на основе суперантигена с иммуностимулятором, который может (а) стимулировать активацию Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавлять ингибирующий Т-клеточный каскад между злокачественными клетками и Т-клеткой, (с) подавляет передачу ингибирующих сигналов, которые приводят к размножению, активации и/или активности Т-клеток через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь, или (d) комбинация двух или более из указанных выше.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у пациента. Способ включает введение пациенту (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, где конъюгат содержит суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с первым антигеном, предпочтительно экспрессируемым злокачественными клетками у пациента, и (ii) эффективное количество иммуностимулятора (например, ингибитора пути контрольных точек), эффективно для по меньшей мере одного или более из (а) стимуляции активации Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавления ингибирующего Т-клеточного сигнального каскада между злокачественными клетками и Т-клеткой, и/или (с) подавления ингибирующего сигнального каскада, которое приводит к размножению, активации и/или активности Т-клеток через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь (т.е. через опосредованный не принадлежащим человеку IgG1 путь иммунного ответа), таким образом усиливая иммунный ответ у пациента по отношению к злокачественным клеткам для лечения злокачественной опухоли. Виды терапии на основе суперантигена могут повышать секрецию интерферона у Т-клетками, которые в свою очередь могут повышать экспрессию PD-L1. Однако до настоящего времени не известно, может ли этот отрицательный эффект подавляться ингибитором PD-1, который компенсирует положительные эффекты повышенной антигенности. В настоящее время открыто, что виды терапии на основе конъюгата суперантигена могут, вероятно, влиять на частоты ответов ингибиторов PD1 или иным образом влиять на клинический исход.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена можно вводить пациенту до, одновременно или после иммуностимулятора. Кроме того, конъюгат суперантигена и иммуностимулятор можно вводить вместе или последовательно с одним или более дополнительных средств, которые усиливают активность и/или избирательность терапевтического эффекта. Такие средства включают, например, кортикостероиды, дополнительные иммуномодуляторы, и такие соединения, предназначенные снижать возможную иммунореактивность у пациента на вводимый конъюгат суперантигена. Например, иммунореактивность на вводимый суперантиген можно снижать путем введения совместно, например, с антителом к CD20 и/или антителом к CD19, которое уменьшает образование антител к суперантигену у пациента.

В некоторых вариантах осуществления суперантиген, присутствующий в конъюгате суперантигена, связывается с Т-клеточным рецептором на поверхности Т-клетки, например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Суперантиген может представлять собой стафилококковый энтеротоксин А или В, его иммунологически реактивный вариант или иммунологически реактивный фрагмент стафилококкового энтеротоксина А или В или его иммунологический вариант. Направляющий фрагмент конъюгата связывается с антигеном, предпочтительно экспрессируемым на оп злокачественной клетке, таким образом, связывая суперантиген со злокачественной клеткой. Направляющий фрагмент можно использовать для направления конъюгата на злокачественные клетки предпочтительно посредством связывания одного или более различных антигенов, например, одного или более антигенов клеточной поверхности, экспрессируемых злокачественными клетками. В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности представляет собой, например, онкофетальный антиген 5T4 злокачественной опухоли, который присутствует на злокачественных клетках, а также определенных злокачественных стволовых клетках. Хотя можно использовать ряд направляющих фрагментов для направления суперантигена на злокачественные клетки, экспрессирующие первый антиген, в некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело, например, антитело к 5T4. В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой фрагмент Fab, который связывает 5T4. В некоторых вариантах осуществления суперантиген в конъюгате содержит аминокислоты 226-458 SEQ ID NO: 7 (также остатки 226-458 SEQ ID NO: 8) или их иммунологически реактивный вариант, или иммунологически реактивный фрагмент каждого из указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор представляет собой ингибитор пути контрольных точек. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор понижает экспрессию или активность лиганда программируемой гибели клеток (PD-L), например, PD-L1 или PD-L2, экспрессируемого на поверхности злокачественных клеток. PD-L представляет собой лиганд, который связывается с рецептором программируемой гибели клеток-1 (PD-1), который экспрессируется на Т-клетках. Определенные злокачественные клетки экспрессируют PD-L, чтобы снизить активацию или

активность Т-клеток через путь контрольных точек PD-1 таким образом, чтобы ускользать от иммунной системы пациента. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор представляет собой антитело к PD-1, которое предотвращает связывание PD-L, например, PD-L1 или PD-L2, с PD-1 экспрессируемым на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 относится к или основано на изоците иммуноглобулина IgG4 человека, который индуцирует в значительно меньшей степени антителозависимую клеточно-опосредованную токсичность (ADCC) по сравнению с изоцитом иммуноглобулина IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 выбирают из группы, состоящей из ниволумаба и пейбролизумаба.

Другие ингибиторы PD-1 включают (i) антитела к PD-1, например, MK-3475 (Merck & Co), пидлизумаб (CureTech), AMP-224 (AstraZeneca/Medimmune) и AMP-514 (AstraZeneca/Medimmune), и (ii) антитела к PD-L1, например, MPDL3280A (Genentech/Roche), MEDI-4736 (AstraZeneca/Medimmune) и MSB0010718C (EMD Serono/Merck KGaA).

В некоторых вариантах осуществления можно использовать другие возможные иммуностимуляторы, такие как агонист 4-1BB (CD137) (например, полностью принадлежащее человеку антитело IgG4 к CD137 урелумаб/BMS-663513), ингибитор LAG3 (например, гуманизованное антитело IgG4 к LAG3 LAG525, Novartis); ингибитор IDO (например, низкомолекулярный INCB024360, Incyte Corporation), ингибитор TGFOI (например, низкомолекулярный галунисертиб, Eli Lilly) и другие рецептор или лиганды, которые встречаются на Т-клетках и/или опухолевых клетках и которые являются пригодными для фармацевтического вмешательства на основе взаимодействий агонист/антагонист, но не посредством ADCC.

Следует понимать, что способ можно использовать для лечения различных злокачественных опухолей, например, злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака желудка, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака и рака кожи.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (i) эффективное количество конъюгата суперантигена, где конъюгат содержит суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с первым антигеном, экспрессируемым злокачественными клетками у пациента, (ii) эффективное количество иммуностимулятора, эффективное по меньшей мере для одного или более из следующего ниже: (a) стимуляции активации Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавления Т-клеточного ингибирующего сигнального каскада между злокачественными клетками и Т-клеткой и/или (c) подавления ингибирующего сигнального каскада, который приводит к размножению, активации и/или активности Т-клеток через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь (т.е. через опосредованный не принадлежащим человеку IgG1 путь иммунного ответа) у пациента, и (iii) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления компонент-суперантиген конъюгата связывается с Т-клеточным рецептором, экспрессируемым на клеточной поверхности Т-клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления суперантиген содержит стафилококковый энтеротоксин А или стафилококковый энтеротоксин В, его иммунологически реактивный вариант или иммунологически реактивный фрагмент стафилококкового энтеротоксина А или В или его вариант. Следует понимать, что направляющий фрагмент в конъюгате может направлять конъюгат на один или более антигенов, экспрессируемых в злокачественных клетках. В некоторых вариантах осуществления первый антиген, на который направлен конъюгат, представляет собой антиген клеточной поверхности, например, онкофетальный антиген 5T4 злокачественной опухоли. Хотя можно использовать различные направляющие фрагменты для направления конъюгата на антиген, экспрессируемый в злокачественных клетках, в одном из вариантов осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело, например, антитело к 5T4. В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент содержит фрагмент Fab, который связывается с антигеном 5T4. В некоторых вариантах осуществления суперантиген в конъюгате содержит аминокислотные остатки 226-458 последовательности SEQ ID NO: 7 (а также остатки 226-458 SEQ ID NO: 8) или ее иммунологически реактивный вариант, или иммунологически реактивный фрагмент каждой из указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор предотвращает связывание PD-L (например, PD-L1 или PD-L2), экспрессируемого в злокачественных клетках, с рецептором PD-1, экспрессируемым на Т-клетке, таким образом, снижая активацию и/или активность Т-клетки. Например, иммуностимулятор может представлять собой ингибитор пути контрольных точек PD-1, например, антитело к PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 относится к или основано на изоците иммуноглобулина IgG4 человека, который предпочтительно индуцирует в значительно меньшей степени ADCC по сравнению с изоцитом иммуноглобулина IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба и пейбролизумаба.

Эти и другие аспекты и признаки изобретения описаны в следующем ниже подробном описании, фигурах и формуле изобретения.

### Краткое описание чертежей

Указанные выше и другие объекты, признаки и преимущества изобретения станут очевидны из следующего ниже описания предпочтительных вариантов осуществления, как проиллюстрировано в сопровождающих чертежах. Также ссылочные элементы идентифицируют общие признаки в соответствующих чертежах. Фигуры не обязательно приведены в масштабе, вместо этого акцент делается на иллюстрации принципов настоящего изобретения, где:

фиг. 1 представляет собой схематическое представление иллюстративного способа лечения по изобретению с использованием конъюгата суперантигена и иммуностимулятора;

фиг. 2 представляет собой выравнивание последовательностей, демонстрирующее гомологичные области А-Е в определенных суперантигенах дикого типа и модифицированных суперантигенах;

фиг. 3 представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую иллюстративному конъюгату суперантигена;

фиг. 4 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую эффект ANYARA® и KEYTRUDA® отдельно или в комбинации на жизнеспособность линии клеток немелкоклеточного рака легких (NSCLC), HCC827. Коэффициенты выживаемости клеток HCC827, культивируемых совместно с Т-клетками, измеряли через 48 часов после обработки ANYARA® (0,1 мг/мл) и/или KEYTRUDA® (0,2 мг/мл) или только средой (контроль). n=3-6; среднее значение  $\pm$ SD \*p<0,05, \*\*p<0,02; \*\*\*p<0,005, как определяют двусторонним t-критерием Стьюдента;

фиг. 5 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую эффект ANYARA® и KEYTRUDA® отдельно или в комбинации на жизнеспособность линии клеток NSCLC, HCC827. Коэффициенты выживаемости клеток HCC827, культивируемых совместно с Т-клетками, измеряли через 48 ч после обработки ANYARA® (10 мг/мл) и/или KEYTRUDA® (0,2 мг/мл) или только средой (контроль). n=3-6; среднее значение  $\pm$ SD. \*p=0,005, \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0005, как определяют двусторонним t-критерием Стьюдента; и

фиг. 6 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую эффект C215Fab-SEA и mAb к PD-1 отдельно или в комбинации на опухолевую нагрузку при опухоли легкого на модели меланомы B16-ЕрСАМ на мышах. Мышам инокулировали внутривенно клетки меланомы B16-ЕрСАМ и обрабатывали C215Fab-SEA (0,5 мг/мышь) и/или mAb к PD-1 (200 мг/мышь). Контрольной группе инъецировали PBS. На сутки 21 мышей умерщвляли, удаляли легкие и подсчитывали количество опухолей. n=7-8 мышей/группе; среднее значение  $\pm$ SEM. \*p=0,05, \*\*p<0,001, как определяют ANOVA.

### Подробное описание

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения злокачественной опухоли у пациента. В частности, изобретение частично основано на открытии того, что направленный иммунный ответ против злокачественной опухоли у пациента можно значительно усиливать комбинацией терапии на основе суперантигена с иммуностимулятором, который может (а) стимулировать активацию Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавлять Т-клеточный ингибирующий сигнальный каскад между злокачественными клетками и Т-клеткой, (с) подавлять ингибирующий сигнальный каскад, который приводит к размножению, активации и/или активности Т-клетки через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь, или (d) комбинацию двух или более из указанных выше. Было выявлено, что введение направленного на опухоль суперантигена (TTS; форма иммунотерапии), совместно со иммуностимулятором (например, ингибитором PD-1), может приводить к усиленному действию против злокачественной опухоли как для суперантигена, так и для иммуностимулятора при их комбинации друг с другом (т.е. средства действуют синергически), что оказывает действие, которое является большим, чем аддитивное действие каждого средства при введении отдельно.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у пациента. Способ включает введение пациенту (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, где конъюгат содержит суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с первым антигеном, предпочтительно экспрессируемым злокачественными клетками у пациента, и (ii) эффективное количество иммуностимулятора (например, ингибитора пути контрольных точек), эффективного по меньшей мере для одного или более из (а) стимуляции активации Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавления Т-клеточного ингибирующего сигнального каскада между злокачественными клетками и Т-клеткой, и/или (с) подавления ингибирующего сигнального каскада, который приводит к размножению, активации и/или активности Т-клетки через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь (т.е. через опосредованный не принадлежащим человеку IgG1 путь иммунного ответа), таким образом, чтобы усиливать иммунный ответ у пациента против злокачественных клеток для лечения злокачественной опухоли.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (i) эффективное количество конъюгата суперантигена, где конъюгат содержит суперантиген, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с первым антигеном, экспрессируемым злокачественными клетками у пациента, (ii) эффективное количество иммуностимулятора, эффективное по меньшей мере для одного или более из (а) стимуляции активации Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавления Т-клеточного ингибирующего сигнального каскада между злокачественными клетками и Т-

клеткой и/или (с) подавления ингибирующего сигнального каскада, который приводит к размножению, активации и/или активности Т-клетки через опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь (т.е. через опосредованный не принадлежащим человеку IgG1 путь иммунного ответа) у пациента, и (iii) фармацевтически приемлемый эксципиент.

#### I. Определения.

Если не определено иное, технические и научные термины, используемые в настоящем описании имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Для целей настоящего изобретения следующие ниже термины определяют ниже.

Как используют в настоящем описании, термины в единственном числе могут означать один или более. Например, утверждение, такое как "лечение суперантигеном и иммуностимулятором" может означать лечение: одним суперантигеном и одним иммуностимулятором; более чем одним суперантигеном и одним иммуностимулятором; одним суперантигеном и более чем одним иммуностимулятором или более чем одним суперантигеном и более чем одним иммуностимулятором.

Как используют в настоящем описании, если не указано иное, что термин "антитело" понимают как интактное антитело (например, интактное моноклональное антитело) или антигенсвязывающий фрагмент антитела, включая интактное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, антитело фагового дисплея, включая полностью принадлежащее человеку антитело, полусинтетическое антитело или полностью синтетическое антитело), которое оптимизировали, конструировали или химически конъюгировали. Примерами антител, которые оптимизировали, являются аффинно зрелые антитела. Примерами антител, которые конструировали, являются оптимизированные по Fc антитела, антитела, сконструированные так, чтобы уменьшать иммуногенность, и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела). Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечные антитела (например, scFv), миниантитела и диатела. Антитело, конъюгированное с фрагментом токсина, является примером химически конъюгированного антитела.

Как используют в настоящем описании, термины "злокачественная опухоль" и "злокачественный" понимают как физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом. Примеры злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, меланому, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, злокачественную опухоль брюшины, печеночно-клеточный рак, рак желудка, включая желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак кости, злокачественную опухоль головного мозга, ретинобластому, рак эндометрия или карциному матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, карциному анального канала, карциному полового члена, рак яичка, а также рак головы и шеи, рак десны или языка. Злокачественная опухоль включает злокачественную опухоль или злокачественные клетки, например, злокачественная опухоль может включать совокупность отдельных раковых клеток или злокачественных клеток, например, лейкоз, или опухоль, включающую совокупность ассоциированных раковых клеток или злокачественных клеток.

Как используют в настоящем описании, термин "иммуноген" представляет собой молекулу, которая вызывает (побуждает, индуцирует или приводит к) иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать образование антител, активацию определенных клеток, таких как, например, специфические иммунокомпетентные клетки, или и то и другое. Иммуноген можно получать из многих типов веществ, такие как, но, не ограничиваясь ими, молекулы от организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, убитые или инактивированные целые клетки или лизаты, синтетические молекулы, и широкого спектра других средств как биологических, так и небологических. Следует понимать, что по существу любая макромолекула (включая природные макромолекулы или макромолекулы, получаемые подходами рекомбинантной ДНК), включая практически все белки, может служить в качестве иммуногенов.

Как используют в настоящем описании, термин "иммуногенность" относится к способности иммуногена вызывать (побуждать, индуцировать или приводить к) иммунный ответ. Различные молекулы могут обладать различными степенями иммуногенности, и известно, что молекула с иммуногенностью, которая является выше по сравнению с другой молекулой, например, способна вызывать (побуждать, индуцировать или приводить к) более высокий иммунный ответ, чем средство с более низкой иммуногенностью.

Как используют в настоящем описании, термин "антиген" относится к молекуле, которую распознают антитела, специфические иммунокомпетентные клетки или те и другие. Антиген можно получать из многих типов веществ, такие как, но, не ограничиваясь ими, молекулы от организмов, такие как, например, белки, субъединицы белков, нуклеиновые кислоты, липиды, убитые или инактивированные це-

лые клетки или лизаты, синтетические молекулы, и широкий спектр других средств, как биологических, так и небιологических.

Как используют в настоящем описании, термин "антигенность" относится к способности антигена, которая заключается в том, что он может быть распознан антителами, специфическими иммунокомпетентными клетками или теми и другими.

Как используют в настоящем описании, термин "главный комплекс гистосовместимости" или "МНС" относится к конкретному кластеру генов, многие из которых кодируют эволюционно родственные белки клеточной поверхности, участвующие в презентации антигена, которые являются важными детерминантами гистосовместимости. МНС I класса или МНС-I функционирует в основном в презентации антигена CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам (CD8<sup>+</sup> Т-клеткам). МНС II класса или МНС-II, функционирует в основном в презентации антигена CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам (CD4<sup>+</sup> Т-клеткам).

Как используют в настоящем описании, термин "получаемый", например, "получаемый от" включает, но не ограничивается ими, например, молекулы дикого типа, получаемые от биологических хозяев, таких как бактерии, вирусы и эукариотические клетки и организмы, и модифицированные молекулы, например, модифицированные химическими средствами или получаемые в рекомбинантных экспрессирующих системах.

Как используют в настоящем описании, термины "серопозитивный", "серологическая реакция" или "серореактивность" понимают как способность средства, такого как молекула, взаимодействовать с антителами в сыворотке млекопитающего, такого как, но, не ограничиваясь им, человек. Это включает взаимодействия со всеми типами антител, включая, например, антитела, специфические к молекулам, и неспецифические антитела, которые связываются с молекулами, независимо от того, инактивируют ли или нейтрализуют ли антитела средство. Как известно в данной области, различные средства могут обладать различной серореактивностью относительно друг друга, где средство с более низкой серореактивностью по сравнению с другим, например, будет взаимодействовать с несколькими антителами и/или обладает более низкой аффинностью и/или авидностью к антителам, по сравнению со средством с более высокой серореактивностью. Это также может включать способность средства вызывать иммунный ответ с образованием антител у животного, такого как млекопитающее, такое как человек.

Как используют в настоящем описании, термины "растворимый Т-клеточный рецептор" или "растворимый TCR" понимают как "растворимый" Т-клеточный рецептор, содержащий цепи полноразмерного (например, мембранносвязанного) рецептора, за исключением того, что трансмембранную область цепей рецептора удаляют или подвергают мутации, таким образом, что этот рецептор, когда экспрессируется клеткой, не будет встраиваться, проходить через или иным образом быть связанным с мембраной. Растворимый Т-клеточный рецептор может содержать только внеклеточные домены или внеклеточные фрагменты доменов рецептора дикого типа (например, не содержит трансмембранный и цитоплазматический домены).

Как используют в настоящем описании, термин "суперантиген" понимают как класс молекул, которые стимулируют подпопуляцию Т-клеток путем связывания с молекулами МНС II класса и доменами V $\beta$  Т-клеточных рецепторов, таким образом, активируя Т-клетки, экспрессирующие конкретные сегменты гена V $\beta$ . Термин включает суперантигены дикого типа, природные суперантигены, например, суперантигены, выделенные из определенных бактерий, или экспрессируемые немодифицированными генами теми же бактериями, а также модифицированные суперантигены, где, например, последовательность ДНК, кодирующую суперантиген модифицировали, например, генетической инженерией, например, чтобы получать слитый белок с направляющим фрагментом, и/или изменять определенные свойства суперантигена, такие как, но, не ограничиваясь ими, его связывание МНС II класса (например, для уменьшения аффинности) и/или его серореактивность, и/или его иммуногенность, и/или антигенность (например, для уменьшения его серореактивности). Определение включает суперантигены дикого типа и модифицированные суперантигены и любые их иммунологически реактивные варианты и/или их фрагменты, описываемые в настоящем описании или в следующих ниже патентах США и патентных заявках: патентах 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, патентных заявках США № 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190, 2002/0051765 и 2001/004 6501, и международной публикации РСТ номер WO/03/094846.

Как используют в настоящем описании, термин "направляющий фрагмент" относится к любой структуре, молекуле или фрагменту, который способен связываться с клеточными молекулами, например, молекулами клеточной поверхности, предпочтительно характерными для заболевания молекулами, такими как антиген, экспрессируемый предпочтительно на раковой (или злокачественной) клетке. Иллюстративные направляющие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, антитела (включая их антигенсвязывающие фрагменты) и т.п., растворимые Т-клеточные рецепторы, интерлейкины, гормоны и факторы роста.

Как используют в настоящем описании, термины "направленный на опухоль суперантиген" или "направленный на злокачественную опухоль суперантиген" понимают как молекулу, содержащую один или более суперантигенов, ковалентно связанных (непосредственно или опосредованно) с одним или более направляющих фрагментов.

Как используют в настоящем описании, термин "Т-клеточный рецептор" понимают как рецептор, который является специфическим к Т-клеткам, и включает понимание термина, как известного в данной области. Термин также включает, например, рецептор, который содержит связанный дисульфидными связями гетеродимер высоковариабельных  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепей, экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с инвариантными цепями CD3, и рецептор, состоящий из вариабельных  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей, экспрессируемых на клеточной мембране в виде комплекса с CD3 в подпопуляции Т-клеток.

Как используют в настоящем описании, термины "терапевтически эффективное количество" и "эффективное количество" понимают как количество активного средства, например, фармацевтически активного средства, или фармацевтической композиции, которое оказывает по меньшей мере определенный эффект в лечении заболевания или состояния. Эффективное количество фармацевтически активного средства(в), используемое для осуществления настоящего изобретения для терапевтического лечения, изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья пациента. Эти термины включают, но не ограничиваются ими, синергические состояния, такие как состояния, описанные в настоящем изобретении, где одно средство отдельно, такое как конъюгат суперантигена или иммуностимулятор (например, антитело к PD-1), может действовать слаб или совсем не действовать, но в комбинации друг с другом, пример, но, не ограничиваясь ими, посредством последовательного дозирования, два или более средств действуют таким образом, что возникает синергический результат.

Как используют в настоящем описании, термины "пациент" и "пациент" относятся к организму, который подлежит лечению способами и композициями, описываемыми в настоящем описании. Такие организмы предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и т.п.), и более предпочтительно включает людей.

Как используют в настоящем описании, термины "лечить", "лечащий" и "лечение" понимают как лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека. Оно включает: (а) ингибирование заболевания, например, остановку его развития; и (б) ослабление заболевания, например, вызывание регрессии состояния болезни; и (с) лечение заболевания. Как используют в отношении терапевтического лечения, термины "предотвращать" или "блокировать" аге понимают как полностью предотвращать или блокировать, или не полностью предотвращать или блокировать (например, частично предотвращать или блокировать) данный акт, действие, активность или событие.

Как используют в настоящем описании, термин "ингибирует рост злокачественной опухоли" понимают как измеряемое замедление, остановка или обращение прогрессирования скорости роста раковых клеток или злокачественных клеток *in vitro* или *in vivo*. Желательно, скорость роста замедляется на 20%, 30%, 50% или 70% или более, как определяют с использованием подходящего анализа для определения скоростей роста клеток. Как правило, обращение прогрессирования скорости роста проводят путем стимуляции или ускорения некротических или апоптотических механизмов гибели клеток в неопластических клетках что приводит к уменьшению массы неоплазии.

Как используют в настоящем описании, термины "вариант", "варианты", "модифицированный", "измененный", "мутантный" и т.п. понимают как белки или пептиды и/или другие средства и/или соединения, которые отличаются от эталонного белка, пептида или другого соединения. Варианты в этом смысле описаны ниже и более подробно описаны в другом месте. Например, изменения последовательности нуклеиновой кислоты варианта могут являться 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, как эталонный пептид. Изменения последовательности нуклеиновой кислоты варианта могут изменять аминокислотную последовательность пептида, кодируемого эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты. Такие изменения нуклеиновой кислоты могут приводить к заменам аминокислот, добавлениям, делециям, слияниям и/или усечениям в белке или пептиде, кодируемым эталонной последовательностью, как обсуждается ниже. Как правило, различия аминокислотных последовательностей ограничены, таким образом, что последовательности эталона и варианта являются схожими по всей длине и во многих областях идентичными. Вариант белка и эталонный белок или пептид могут отличаться аминокислотной последовательностью одной или более замен, добавлений, делеций, слияний и/или усечений, которые могут присутствовать в любой комбинации. Вариант также может представлять собой фрагмент белка или пептида по изобретению, который отличается от эталонной белковой или пептидной последовательности тем, что является короче чем эталонная последовательность, в частности в результате концевой или внутренней делеций на концах. Другой вариант белка или пептид по изобретению также включает белок или пептид, который сохраняет по существу такую же функцию или активность как эталонный белок или пептид. Вариант также может представлять собой: (i) вариант, в котором



один или более аминокислотных остатков заменяют консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком, и такой замещенный аминокислотный остаток может представлять собой или может не представлять собой остаток, кодируемый генетическим кодом, или (ii) вариант, в котором один или более аминокислотных остатков содержат заместительную группу, или (iii) вариант, в котором зрелый белок или пептид является слитым с другим соединением, таким как соединение для увеличения времени полужизни белка или пептида (например, полиэтиленгликоль), или (iv) вариант, в котором дополнительные аминокислоты являются слитыми со зрелым белком или пептидом, таким как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которую используют для очистки зрелого белка или пептида. Варианты можно получать способами мутагенеза и/или изменяющими механизмами, такими как химическими изменения, слияния, вспомогательные средства и т.п., включая такие, которые применяют для нуклеиновых кислот, аминокислот, клеток или организмов, и/или можно получать рекомбинантными способами.

Как используют в настоящем описании, термин "последовательное дозирование" и родственная терминология относятся к введению по меньшей мере одного суперантигена по меньшей мере с одним иммуностимулятором и включает разнесенное в определенном порядке введение доз этих средств (например, разнесенное по времени) и изменения величин доз. Это предусматривает то, что один средство вводят до введения, перекрывая введение (частично или полностью) или после введения другого средства. Этот термин, как правило, учитывает лучшую схему введения для получения синергической комбинации по меньшей мере одного суперантигена и по меньшей мере одного иммуностимулятора. Такой стратегией дозирования (например, последовательным дозированием) можно достигать синергического действия комбинированного введения суперантигена и иммуностимулятора. Кроме того, термин "последовательное дозирование" и родственная терминология также включает введение по меньшей мере одного суперантигена, одного иммуностимулятора и более или более необязательных дополнительных соединений, таких как, например, кортикостероид, иммуномодулятор и другое средство, сконструированное для снижения возможной иммуноактивности к конъюгату суперантигена, вводимому пациенту.

Как используют в настоящем описании, термины "системный" и "системно" в отношении введения понимают как введение средства, таким образом, что средство подвергается действию по меньшей мере одной системы, связанной с целым организмом, такой как, но, не ограничиваясь ими, кровеносная система, иммунная система и лимфатическая система, а не только локализованной части организма, такой как, но, не ограничиваясь ими, ведение внутрь опухоли. Таким образом, например, системная терапия или введенное системно средство представляет собой терапию или средство, при котором по меньшей мере одна система, связанная со всем организмом подвергается действию терапии или средства, в отличие от просто ткани-мишени.

Как используют в настоящем описании, термин "парентеральное введение" включает любую форму введения, при котором соединение всасывается у пациента без участия всасывания через кишечник. Иллюстративные парентеральные введения, которые используют в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, внутримышечное, внутривенное, интраперитонеальное или внутрисуставное введение.

В тех случаях, когда использование термина "приблизительно" предшествует количественной величине, настоящее изобретение также относится к самой конкретной количественной величине, если конкретно не указано иное. Как используют в настоящем описании, термин "приблизительно" относится к изменению  $\pm 10\%$  от номинальной величины, если не указано или подразумевается иное.

В различных местах в настоящем описании величины описаны в группах или в диапазонах. Конкретно предполагают, что описание включает каждую и любую отдельную подкомбинацию представителей таких групп и диапазонов. Например, целое число в диапазоне от 0 до 40 конкретно предназначено индивидуально раскрывать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40, и целое число в диапазоне от 1 до 20 конкретно предназначено индивидуально раскрывать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

На всем протяжении описания, когда композиции и наборы описаны как имеющие, включающие, или содержащие конкретные компоненты, или когда процессы и способы описаны как имеющие, включающие или состоящие из конкретных этапов, предусмотрено, что, дополнительно, существуют композиции и наборы по настоящему изобретению, которые по существу содержат или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы по настоящему изобретению, которые по существу содержат или состоят из перечисленных этапов обработки и способа.

Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описываемого в настоящем описании, можно комбинировать различными путями, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения, будь то явные или подразумевающиеся в настоящем описании. Другими словами, в этой заявке варианты осуществления описаны и проиллюстрированы способом, который позволяет написать и проиллюстрировать четкую и лаконичную заявку, но подразумевают и будет понятно, что варианты осуществления можно различным образом объединять или разделять не выходя за настоящие указания и изобретение(я). Например, следует понимать, что все признаки, описываемые и

иллюстрируемые в настоящем описании можно применять ко всем аспектам изобретения(й), описываемого и иллюстрируемого в настоящем описании.

## II. Конъюгат суперантигена А. Суперантигены.

Суперантигены представляют собой бактериальные белки, белки вирусов и конструируемые человеком белки, способные активировать Т-лимфоциты, например, в пикомолярных концентрациях. Суперантигены также могут активировать большие подпопуляции Т-лимфоцитов (Т-клетки). Суперантигены могут связываться с главным комплексом гистосовместимости I (МНСI), не подвергаясь процессированию, и в частности могут связываться с консервативными областями вне антигенсвязывающей бороздки на молекулах МНС II класса, избегая большей части полиморфизма в общепринятом участке связывания пептида. Суперантигены также могут связываться с V $\beta$ -цепью Т-клеточного рецептора (TCR), а не связываться с гипервариабельными петлями Т-клеточного рецептора. Примеры бактериальных суперантигенов включают, но не ограничиваются ими, стафилококковый энтеротоксин (SE), стрептококковый пирогенный 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 (SEM).

Были выделены и клонированы полинуклеотидные последовательности, кодирующие многие суперантигены, и использовали суперантигены, экспрессируемые этими последовательностями или модифицированными (вновь сконструированными) полинуклеотидными последовательностями, в терапии злокачественной опухоли (см., ANYARA®, обуждается ниже). Суперантигены, экспрессируемые этими полинуклеотидными последовательностями, могут являться суперантигенами дикого типа, модифицированными суперантигенами или суперантигены дикого типа или модифицированными суперантигенами, конъюгированными или слитыми с направляющими фрагментами. Суперантигены можно вводить млекопитающему, такому как человек, непосредственно, например, путем инъекции, или можно обеспечивать их доставку, например, посредством подвергания крови пациента воздействию суперантигена вне организма, или, например, путем помещения гена, кодирующего суперантиген, внутри млекопитающего, в отношении которого необходимо проводить лечение, (например, известными способами генотерапии и векторами, такими как, например, посредством клеток, содержащих и способных экспрессировать ген) и экспрессии гена внутри млекопитающего.

Примеры суперантигенов и их введение млекопитающим описаны в следующих ниже патентах США и патентных заявках: патентах 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, патентных заявках США № 2003/0157113, 2003/0124142, 2002/0177551, 2002/0141981, 2002/0115190 и 2002/0051765, и международной публикации РСТ номер WO/03/094846.

## В. Модифицированные суперантигены.

В объеме настоящего изобретения суперантигены можно конструировать различными способами, включая модификации, которые сохраняют или повышают способность суперантигена стимулировать Т-лимфоциты, и могут, например, изменять другие аспекты суперантигена, такие как, например, его серореактивность или иммуногенность. Модифицированные суперантигены включают синтетические молекулы, которые обладают активностью суперантигена (например, способностью активировать подпопуляции Т-лимфоцитов).

Предусмотрено, что можно проводить различные изменения полинуклеотидных последовательностей, кодирующих суперантиген, без заметной потери его биологической ценности или активности, а именно индукции Т-клеточного ответа для того, чтобы приводить к цитотоксичности опухолевых клеток. Кроме того, аффинность суперантигена к молекуле МНС II класса можно уменьшать с минимальным воздействием на цитотоксичность суперантигена. Это, например, может помочь снижать токсичность, которая может иным образом возникать, если суперантиген сохраняет свою способность дикого типа связываться с антигенами МНС II класса (т.к. в таком случае экспрессирующие II класс клетки, такие как клетки иммунной системы, также могут поддаваться влиянию ответа на суперантиген).

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

В некоторых вариантах осуществления суперантиген можно модифицировать таким образом, чтобы его серореактивность являлась сниженной по сравнению с эталонным суперантигеном дикого типа, но его способность активировать Т-клетки сохраняется или является повышенной относительно дикого типа. Один из способов получения таких модифицированных суперантигенов включает замену определенных аминокислот в определенных областях из одного суперантигена другими. Это возможно благодаря тому, что многие суперантигены, включая, но, не ограничиваясь ими, SEA, SEE и SED, обладают общей

гомологией последовательности на определенных участках, которые связаны с определенными функциями (Magack and Kappler (1990) Science 248(4959): 1066; также см. фиг. 2, где показана область гомологии для различных антигенов дикого типа и сконструированных суперантигенов). Например, в некоторых вариантах настоящего изобретения суперантиген, который обладает желаемым индуцирующим активацию Т-клеток ответом, но нежелательной высокой серореактивностью, модифицируют таким образом, что получаемый суперантиген сохраняет свою способность активировать Т-клетки, но обладает пониженной серореактивностью.

Специалистам в данной области известно и понятно, что сыворотка людей, как правило, содержит разные титры антител к суперантигенам. Например, для стафилококковых суперантигенов, например, относительные титры составляют TSST-1>SEB>SEC-1>SE3>SEC2>SEA>SED>SEE. В результате серореактивность, например, SEE (стафилококкового энтеротоксина E) является ниже, чем серореактивность, например, SEA (стафилококкового энтеротоксина A). На основании этих данных специалист в данной области может предпочесть вводить суперантиген с низким титром, такой как, например, SEE, вместо суперантигена с высоким титром, такого как, например, SEB (стафилококковый энтеротоксин B). Однако как в то же время было выявлено, различные суперантигены обладают различными свойствами активации Т-клеток относительно друг друга, и для суперантигенов дикого типа наилучшим образом активирующие Т-клетки суперантигены, как правило, также обладают нежелательной высокой серореактивностью.

Эти относительные титры в некоторых случаях соответствуют возможным проблемам с серореактивностью, таким как проблемы с нейтрализующими антителами. Таким образом, использование суперантигена с низким титром, такого как SEA или SEE, может являться полезным для снижения или устранения серореактивности парентерально вводимых суперантигенов.

Суперантиген с низким титром обладает низкой серореактивностью, как измеряют, например, посредством характерных антител к суперантигену в общей популяции. В некоторых случаях он может также обладать низкой иммуногенностью. Такие суперантигены с низким титром можно модифицировать с сохранением их низкого титра как описано в настоящем описании.

Подходы для модификации суперантигенов можно использовать для создания суперантигенов, которые обладают желаемыми свойствами активации Т-клеток и пониженной серореактивностью, и в некоторых случаях также пониженной иммуногенностью. Учитывая тот факт, что определенные области гомологии суперантигенов связаны с серореактивностью, можно конструировать рекомбинантный суперантиген, который обладает желаемой активацией Т-клеток и желаемой серореактивностью и/или иммуногенностью. Кроме того, белковые последовательности и иммунологическую перекрестную реактивность суперантигенов или стафилококковых энтеротоксинов разделяют на две родственные группы. Одна группа состоит из SEA, SEE и SED. Вторая группа представляет собой SPEA, SEC и SEB. Таким образом, можно выбирать суперантигены с низким титром для снижения или устранения перекрестной реактивности с высоким титром или эндогенными антителами, направленными на стафилококковые энтеротоксины.

Области в суперантигенах, которые, как полагают, играют роль в серореактивности, включают, например, область А, которая содержит аминокислотные остатки 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27; область В, которая содержит аминокислотные остатки 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49; область С, которая содержит аминокислотные остатки 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 и 84; область D, которая содержит аминокислотные остатки 187, 188, 189 и 190; и область E, которая содержит аминокислотные остатки, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226 и 227 (см. патент США № 7125554, и фиг. 2 в настоящем описании). Таким образом, предусмотрено, что эти области можно подвергать мутации с использованием, например, замены аминокислоты, с получением суперантигена с измененной серореактивностью.

Полипептидные или аминокислотные последовательности для перечисленных выше суперантигенов можно получать из любого банка данных последовательностей, например, Protein Data Bank и/или GenBank. Иллюстративные номера доступа GenBank включают, но не ограничиваются ими, SEE представляет собой P12993; SEA представляет собой P013163; SEB представляет собой P01552; SEC1 представляет собой P01553; SED представляет собой P20723 и SEN представляет собой AAA19777.

В некоторых вариантах настоящего изобретения последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2) можно модифицировать таким образом, что аминокислоты в любой из идентифицированных областей А-Е (см., фиг. 2) заменяют другими аминокислотами. Такие замены включают например, K79, K81, K83 и D227 или K79, K81, K83, K84 и D227, или, например, K79E, K81E, K83S и D227S или K79E, K81E, K83S, K84S и D227A. В некоторых вариантах осуществления суперантиген представляет собой SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3; также см. патент США № 7125554) или SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 4; также см. патент США № 7226601).

#### 1. Модифицированные полинуклеотиды и полипептиды.

Биологический функциональный эквивалент полинуклеотида, кодирующего природный или эталонный суперантиген, может содержать полинуклеотид, который сконструировали так, чтобы он содержал отдельные последовательности, при этом одновременно сохраняя способность кодировать природный или эталонный суперантиген. Это можно проводить вследствие вырожденности генетического кода,

например, наличия многих кодонов, которые кодируют одни и те же аминокислоты. В одном из примеров, моно вводить распознаваемую рестрикционными ферментами последовательность в полинуклеотид, при этом не нарушая способность такого полинуклеотида кодировать белок. Другие полинуклеотидные последовательности могут кодировать суперантигены, которые являются различными, но функционально по существу эквивалентными по меньшей мере по одному биологическому свойству или активности (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% биологического свойства или активности, например, без ограничения, способности индуцировать Т-клеточный ответ, который приводит к цитотоксичности опухолевых клеток) эталонному суперантигену.

В другом примере полинуклеотид может представлять собой (и кодировать) суперантиген, функционально эквивалентный эталонному суперантигену, хотя он может содержать больше значительных изменений. Определенные аминокислоты можно заменять другими аминокислотами в структуре белка без заметной потери двусторонней связывающей способности со структурами, такими как, например, антигенсвязывающие области антител, участки связывания на молекулах субстратов, рецепторы и т.д. Кроме того, замены консервативных аминокислот могут не нарушать биологическую активность белка, получаемое структурное изменение часто не является изменением, которое влияет на способность белка выполнять свою предполагаемую функцию. Таким образом, предусматривают, что такие различные изменения можно проводить в последовательности генов и белков, описываемых в настоящем описании, при этом все еще находясь в соответствии с целями настоящего изобретения.

Замены аминокислот можно конструировать так, чтобы использовать преимущество относительно сходства заместителей боковых цепей аминокислоты, например, их гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и/или т.п. Анализ размера, формы и/или типа заместителей боковых цепей аминокислот выявляет, что аргинин, лизин и/или гистидин являются положительно заряженными остатками; что аланин, глицин и/или серин имеют сходный размер, и/или что фенилаланин, триптофан и/или тирозин, как правило, имеют схожую форму. Таким образом, на основании этих обсуждений аргинин, лизин и/или гистидин; аланин, глицин и/или серин, и/или фенилаланин, триптофан и/или тирозин определяют в настоящем описании как биологически функциональные эквиваленты. Кроме того, можно вводить неприродные аминокислоты. Подходы получения замен аминокислот другой природной и неприродной аминокислотой описаны в патенте США № 77 63253.

В отношении функциональных эквивалентов следует понимать, что, подразумеваемый в определении "биологически функциональный эквивалентный" белок и/или полинуклеотид является концепцией того, что существует ограниченное число изменений, которые можно проводить в определенной части молекулы, при этом сохраняя молекулу с приемлемым уровнем эквивалентной биологической активности. Таким образом, считают, что биологически функциональные эквиваленты являются такими белками (и полинуклеотидами), где выбранные аминокислоты (или кодоны) можно заменять другими по существу без нарушения биологической функции. Функциональная активность включает индукцию Т-клеточного ответа, что приводит к цитотоксичности опухолевых клеток.

Кроме того, предусмотрено, что модифицированный суперантиген можно получать заменой гомологичных областей различных белков посредством "замены доменов", что включает получение химерных молекул с использованием различных, в данном случае, родственных полипептидов. Сравнивая различные суперантигенные белки для идентификации функционально родственных областей этих молекул (см., например, фиг. 2), можно заменять родственные домены этих молекул таким образом, чтобы определять важность этих областей для функции суперантигена. Эти молекулы могут иметь дополнительную ценность, которая заключается в том, что такие "химеры" могут отличаться от природных молекулы, при этом, возможно, обеспечивая ту же функцию.

В некоторых вариантах осуществления суперантиген содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной последовательности эталонного суперантигена, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, где суперантиген необязательно сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% биологической активности или свойств эталонного суперантигена.

В некоторых вариантах осуществления суперантиген содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется нуклеиновой кислотой, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей суперантиген, выбранной из группы, состоящей 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.

Идентичность последовательности можно определять различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) с использованием алгоритма, применяемого 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, включенных посредством ссылки) адаптируют для поиска сходство последовательностей. Для обсуждения основных проблем поиска баз данных последовательностей см. Altschul et al. (1994) *Nature Genetics* 6:119-129, которая полностью включена посредством ссылки. Специалисты в данной области могут определять подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для получения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых полноразмерных последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описаний, выравниваний, ожиданий (т.е. порога статистической значимости для отчетов совпадений с последовательностям базы данных), порог, матрица и фильтр находятся в настройках по умолчанию. Оценочная матрица по умолчанию, используемая в blastp, blastx, tblastn и tblastx, представляет собой матрицу BLOSUM62 (Henikoff et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, полностью включенная посредством ссылки). Четыре параметра blastn можно подобрать так, как указано ниже: B Q=10 (штраф за создание пропуска); R=10 (штраф за продление пропуска); wink=1 (образует слова-подсказки в каждом положении wink.sup.th по запросу); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, в котором получают выравнивания с пропусками). Эквивалентными настройками параметров Blastp могут являться Q=9; R=2; wink=1 и gapw=32. Поиск также можно проводить с использованием параметра BLAST Advanced Option NCBI (National Center for Biotechnology Information) (например, -G, штраф за открытие пропуска [целое число]: по умолчанию=5 для нуклеотидов/ 11 для белков; -E, штраф за продление пропуска [целое число]: по умолчанию=2 для нуклеотидов/1 для белков; -q, штраф за несоответствие нуклеотида [целое число]: по умолчанию= -3; -r, вознаграждение за совпадение нуклеотида [целое число]: по умолчанию=1; -e, ожидаемое значение [действительное число]: по умолчанию=10; -W, размер слова [целое число]: по умолчанию=11 для нуклеотидов/28 для megablast/3 для белков; -y, порог отсечения (X) для продления blast в битах: по умолчанию=20 для blastn/7 для других; -X, значение порога отсечения X для выравнивания с пропусками (в битах): по умолчанию=15 для всех программ, не применим для blastn; и -Z, конечное значение порога отсечения X для выравнивания с пропусками (в битах): 50 для blastn, 25 для других). Для попарных выравниваний белков также можно использовать ClustalW (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosum62 и штраф за создание пропуска=10 и штраф за продление пропуска=0,1). При сравнении последовательностей с использованием Bestfit, доступной в пакете GCG версия 10.0 используют параметры ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за продление пропуска), и эквивалентные настройки при сравнениях белков представляют собой GAP=8 и LEN=2.

#### С. Направленные суперантигены.

Для повышения специфичности суперантиген предпочтительно конъюгируют с направляющим фрагментом с получением направленного конъюгата суперантигена, который связывается с антигеном, предпочтительно экспрессируемым злокачественной клеткой, например, антигеном клеточной поверхности, таким как 5T4. Направляющий фрагмент представляет собой носитель, который можно использовать для связывания суперантигена со злокачественными клетками, например, поверхностью злокачественных клеток. Направленный конъюгат суперантигена должен сохранять способность активировать большое количество Т-лимфоцитов. Например, направленный конъюгат суперантигена должен активировать большие количества Т-клеток и направлять их в ткани, содержащие опухолеассоциированный антиген, связанный с направляющим фрагментом. В таких ситуациях специфические клетки-мишени предпочтительно уничтожают, оставляя оставшуюся часть организма относительно неповрежденной. Этот тип терапии является желательным, т.к. неспецифические средства против злокачественных опухолей, такие как цитостатические химиотерапевтические лекарственные средства, являются неспецифическими и уничтожают большие количества клеток, не связанных с опухолями, подлежащими лечению. Например, исследования с направленными конъюгатами суперантигенов продемонстрировали, что воспаление с инфильтрацией цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) в опухолевую ткань быстро увеличивается в ответ на первую инъекцию направленного суперантигена (Dohlsten et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9791-9795). Такое воспаление с инфильтрацией CTL в опухоль является одним из основных эффектов противоопухолевой терапии направленных суперантигенов.

Направленные на опухоль суперантигены являются иммунотерапией против злокачественной опухоли и представляют собой терапевтические слитые белки, содержащие направляющий фрагмент, конъюгированный с суперантигеном (Dohlsten et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9287-9291; Dohlsten et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8945-8949).

Направляющий фрагмент может в принципе являться любой структурой, которая способна связываться с клеточной молекулой, например, молекулой клеточной поверхности и предпочтительно представляет собой характерную для заболевания молекулу. Направленная молекула (например, антиген), против которой направлен направляющий фрагмент, как правило, отличается от (а) v $\rho$ -цепи эпитопа, с которым связывается суперантиген, и (б) эпитопов МНС II класса, с которыми связываются суперантигены. Направляющий фрагмент можно выбирать из антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, растворимых Т-клеточных рецепторов, факторов роста, интерлейкинов (например, интерлейкин-2), гормонов и т.д.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело (например, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечное антитело и т.д.). Антитела являются

очень универсальными и пригодными специфическими к клетке направляющими фрагментами, т.к., как правило, их можно получать против любого представляющего интерес антигена клеточной поверхности. Моноклональные антитела получают против рецепторов клеточной поверхности, опухолеассоциированных антигенов и специфических к линии лейкоцитов маркеров, таких как антигены CD. Гены варибельной области антитела можно легко выделять из гибридомных клеток хорошо известными в данной области способами. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены, которые можно использовать для получения направляющего фрагмента, могут включать, но не ограничиваются ими, gp100, Melan-A/MART, MAGE-A, MAGE (антиген меланомы E), MAGE-3, MAGE-4, MAGEA3, тирозиназу, TRP2, NY-ESO-1, CEA (раково-эмбриональный антиген), PSA, p53, маммаглобин-А, сурвивин, Muc1 (муцин1)/DF3, металлопанстимулин-1 (MPS-1), изоформа 1B1 цитохрома P450, связывающий белок 90K/Mac-2, Ер-CAM (МК-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, LAGE-1/CAMEL, TAGE-1, GAGE, 5T4, gp70, SCP-1, с-мус, циклин B1, MDM2, p62, Кос, 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, связывающий белок 90K/Mac-2, MDM2, NY/ESO и LMNA.

Иллюстративные направленные на злокачественную опухоль антитела могут включать, но не ограничиваются ими, антитела к CD19, антитела к CD20, антитела к 5T4, антитела к Ер-CAM, антитела к Her-2/neu, антитела к EGFR, антитела к CEA, антитела к специфическому мембранному антигену предстательной железы (PSMA) и антитела к IGF-1R. Следует понимать, что суперантиген можно конъюгировать с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см., WO8907947) или C242Fab (см., WO9301303).

Примеры направленных на опухоль суперантигенов, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7, см. фиг. 3).

В предпочтительном варианте осуществления предпочтительный конъюгат представляет собой конъюгат суперантигена, известный как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA®, который представляет собой слитый белок фрагмента Fab антитела к 5T4 и суперантигена SEA/E-120. ANYARA® содержит две белковые цепи, которые совокупно включают сконструированный суперантиген стафилококкового энтеротоксина (SEA/E-120) и направленный на 5T4 Fab, содержащий модифицированные последовательности варибельной области 5T4, слитые с последовательностями константной области антитела мыши IgG1/к C242. Первая цепь белка содержит остатки от 1 до 458 SEQ ID NO: 7 (также см. SEQ ID NO: 8) и включает химерную 5T4 Fab тяжелую цепь Fab 5T4, соответствующую остаткам от 1 до 222 SEQ ID NO: 7, и суперантиген SEA/E-120, соответствующий остаткам от 226 до 458 SEQ ID NO: 7, ковалентно связанный через трипептидный линкер GGP, соответствующий остаткам 223-225 SEQ ID NO: 7. Вторая цепь содержит остатки от 459 до 672 SEQ ID NO: 7 (также см., SEQ ID NO: 9) и включает легкую цепь химерного Fab 5T4. Две белковые цепи удерживаются вместе посредством нековалентных взаимодействий между тяжелыми и легкими цепями Fab. Остатки 1-458 SEQ ID NO: 7 соответствуют остаткам 1-458 SEQ ID NO: 8, и остатки 459-672 SEQ ID NO: 7 соответствуют остаткам 1-214 SEQ ID NO: 9. ANYARA® содержит белки SEQ ID NOS: 8 и 9, удерживаемые друг с другом посредством нековалентных взаимодействий между тяжелыми цепями Fab и легкими цепями Fab. ANYARA® индуцирует опосредованный Т-клетками цитолиз злокачественных клеток в концентрациях приблизительно 10 пМ, и компонент суперантиген конъюгата сконструировали так, чтобы он обладал низким связыванием с антителами человека и МНС II класса.

Предусмотрено, что другие антитела на основе направляющих фрагментов можно конструировать, модифицировать, экспрессировать и очищать с применением известных в данной области способов, и оно обсуждается более подробно ниже.

Другой тип направляющего фрагмента включает растворимый Т-клеточный рецептор (TCR). Некоторые формы растворимого TCR могут содержать либо только внеклеточные домены, либо внеклеточные и цитоплазматические домены. Также могут быть предусмотрены другие модификации TCR с получением растворимого TCR, в котором трансмембранные домены удаляли и/или изменяли, таким образом, что TCR не является мембраносвязанным, 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.

Направляющий фрагмент можно конъюгировать с суперантигеном с применением рекомбинантных способов или химического связывания направляющего фрагмента с суперантигеном.

#### 1. Рекомбинантный линкер (слитый белок).

Предусмотрено, что ген, кодирующий суперантиген, связанный непосредственно или опосредованно (например, с помощью содержащего аминокислоту линкера) с направляющим фрагментом, можно получать и экспрессировать с применением общепринятых технологий рекомбинантных ДНК. Например, аминоконец модифицированного суперантигена можно связывать с карбокси-концом направляющего фрагмента или наоборот. Для антител или фрагментов антител, которые могут служить в качестве направляющих фрагментов, для получения слитого белка можно использовать легкую или тяжелую цепь.

Например, для фрагмента Fab amino-конец модифицированного суперантигена можно связывать с первым константным доменом тяжелой цепи антитела (CH<sub>1</sub>). В некоторых случаях модифицированный суперантиген можно связывать с фрагментом Fab посредством связи домена VH и VL с суперантигеном. Альтернативно, пептидный линкер можно использовать для присоединения суперантигена и направляющего фрагмента друг к другу. В случае, 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, 3-7 аминокислотных остатков. Иллюстративные линкер представляет собой трипептид - GlyGlyPro-. Эти подходы успешно использовали в конструировании и производстве конъюгата суперантигена ANYARA®.

## 2. Химическое связывание.

Также предусмотрено, что суперантиген можно связывать с направляющим фрагментом посредством химического связывания. Для химического связывания суперантигена с направляющим фрагментом необходимым может являться линкер, например, пептидный линкер. Пептидный линкер предпочтительно является гидрофильным и предоставляет одну или более реакционноспособных молекул, выбранных из амидов, тиоэфиров, дисульфидов и т.д. (см. патенты США № 5858363, 6197299 и 6514498). Также предусмотрено, что для химического связывания можно использовать гомо- или гетеробифункциональные сшивающие реагенты. При химическом связывании суперантигена с направляющим фрагментом часто используют функциональные группы (например, первичные аминогруппы или карбоксигруппы), которые присутствуют во многих положениях в соединениях.

## D. Экспрессия суперантигенов и конъюгатов суперантигенов.

В случае, когда применяют технологии рекомбинантных ДНК, суперантиген или конъюгат суперантиген-направляющий фрагмент можно экспрессировать с использованием стандартных экспрессирующих векторов и экспрессирующих систем.

Экспрессирующие векторы, которые конструируют генетической инженерией таким образом, чтобы они содержали последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей 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).

Клетки-хозяева можно генетически конструировать, например, способами трансформации или трансфекции для введения последовательностей нуклеиновых кислот и экспрессии суперантигена. Введение последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-хозяин можно проводить трансфекцией осаждением фосфата кальция, опосредованной DEAE-декстран трансфекцией, микроинъекцией, опосредованной катионным липидом трансфекцией, электропорацией, трансдукцией, введением при соскабливании, баллистическим введением, инфицированием 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*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Репрезентативные примеры подходящих клеток-хозяев включают бактериальные клетки, такие как клетки стрептококков, стафилококков, *E. coli*, стрептомицеты и *Bacillus subtilis*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки и клетки аспергиллы; клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как клетки CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, ВНК, 293 и меланомы Bowes.

Примеры продуцирующих систем для суперантигенов можно найти, например, в патенте США № 6962694.

## E. Очистка белка.

Суперантиген и/или конъюгаты суперантиген-направляющий фрагмент предпочтительно очищают перед использованием, что можно проводить с использованием различных протоколов очистки. После отделения суперантигена или конъюгата суперантиген-направляющий фрагмент от других белков, представляющий интерес белок можно дополнительно очищать хроматографическими и электрофоретическими способами с получением частичной или полной очистки (или очистки до однородности). Аналитические способы, особенно подходящие для получения очищенного пептида, представляют собой ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрофокусирование. Термин "очищенный", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения композиция, отделенной от других компонентов, где представляющую интерес макромолекулу (например, белок) очищают до любой степени относительно ее исходного состояния. Как правило, термин "очищенная" относится к макромолекуле, которую подвергли фракционированию для удаления различных других компонентов, и которая по существу сохраняет свою биологическую активность. Термин "в значительной степени очищенная" относится к композиции, в которой представляющая интерес макромолекула образует основной компонент композиции, такой как составляющий приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более от содержания композиции.

Специалистам в данной области известны различные способы количественного определения степе-

ни очистки белка, включая, например, определение специфической активности активной фракции и оценка количества данного белка в фракции анализом SDS-PAGE, высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) или любым другим способом фракционирования. Различные способы, пригодные для использования в очистке белка включают, например, осаждение сульфатом аммония, PEG, антитела и т.п. или посредством тепловой денатурации с последующим центрифугированием; этапы хроматографии, такой как ионнообменная хроматография, гель-фильтрация, хроматография с обращенной фазой, хроматография на гидроксипатите, аффинная хроматография; изоэлектрофокусирование; электрофорез в геле и сочетаний таких и других техник. Предусмотрено, что порядок проведения различных этапов очистки можно изменять, или что определенные этапы можно пропускать, и все еще получать подходящий способ получения в значительной степени очищенного белка или пептида.

### III. Иммуностимулятор.

Предусмотрено, что эффективность иммуностимулятора можно повышать путем введения иммуностимулятора пациенту, которого необходимо лечить, совместно с конъюгатом суперантигена, содержащим суперантиген и направляющий фрагмент. Иллюстративные иммуностимуляторы могут, например: (a) стимулировать активацию Т-клеточного сигнального каскада, (b) подавлять Т-клеточный ингибирующий сигнальный каскад между злокачественными клетками и Т-клеткой, (c) подавлять ингибирующий сигнальный каскад, который приводит к размножению, активации и/или активности Т-клетки через опосредованный не принадлежащим человеку IgG1 путь иммунного ответа, например, опосредованный иммуноглобулином IgG4 человека путь, (d) сочетание (a) и (b), (e) сочетание (a) и (c), (f) сочетание (b) и (c) и (d) сочетание (a), (b) и (c).

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор представляет собой ингибитор пути контрольных точек. В настоящее время идентифицированы различные ингибирующие пути контрольных точек Т-клеток, например, путь иммунных контрольных точек PD-1 и путь иммунных контрольных точек антигена 4 цитотоксического Т-лимфоцита (CTLA-4).

Sundstedt et al. (Sundstedt et al. (2012) *J. Immunother.* 35:344-35) продемонстрировали, что комбинация направленного на опухоль суперантигена (TTS) с антителом к CTLA4 IgG1 на модели меланомы B16 на мышцах являлась более активной, чем отдельные компоненты. В этом исследовании, несмотря на то, что суперантиген вызывал инфильтрацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, также в микроокружении опухоли аккумуляровалось большое количество регуляторных Т-клеток (Treg). Полагают, что повышение уровня этих супрессорных регуляторных клеток является прямым следствием терапии TTS, что может ограничивать ее эффективность. Авторы отмечали, что вероятнее всего крайне высокое повышение уровня CTLA-4 в следствие TTS привело к тому, что антитело к CTLA-4 в основном находилось в популяции Treg. Без ограничения конкретной теорией, предусмотрено, что антитело IgG1 CTLA-4 является цитотоксическим для популяции Treg, которая является центральное для его активности против злокачественной опухоли при использовании в комбинации с TTS. В противоположность этому, в некоторых вариантах настоящего изобретения используют антитела, для которых не известно, что они источают Treg, например, антитела IgG4, направленные на контрольные точки, не относящиеся к CTLA-4 (например, ингибиторы антитела IgG4 к PD-1), и, таким образом, они представляют собой новую комбинацию, синергическое действие которой опосредовано другими механизмами действия.

PD-1 представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности Т-клеток, который служит в качестве контрольной точки иммунной системы, которая ингибирует или иным образом модулирует активность Т-клеток в подходящий момент времени, предотвращая гиперактивный иммунный ответ. Тем не менее, злокачественные клетки могут использовать преимущество этой контрольной точки посредством экспрессии лигандов, например, PD-L1, PD-L2 и т.д., которые взаимодействуют с PD-1 на поверхности Т-клеток, выключая или модулируя активность Т-клеток. С помощью такого подхода злокачественная опухоль может ускользать от опосредованного Т-клетками иммунного ответа.

В пути CTLA-4 взаимодействие CTLA-4 на Т-клетке с его лигандами (например, CD80, также известного как B7-1, и CD86) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (а не злокачественных клеток) приводит к ингибированию Т-клеток. В результате, лиганд, который ингибирует активацию или активность Т-клеток (например, CD80 или CD86), предоставляется антигенпрезентирующей клеткой (ключевым типом клеток в иммунной системе), а не злокачественной клеткой. Хотя связывание CTLA-4 и PD-1 оказывает схожее отрицательное влияние на Т-клетки, время подавления, ответственные сигнальные механизмы и анатомические местоположения иммунного ингибирования этими двумя иммунными контрольными точками отличается (*American Journal of Clinical Oncology*. Volume 39, Number 1, February 2016). В отличие от этого CTLA-4, который ограничен ранней начальной фазой активации Т-клеток, PD-1 действует гораздо позже во время эффекторной фазы (Keir et al. (2008) *Annu. Rev Immunol.*, 26:677-704). Таким образом, ингибирование Т-клеток, опосредованное через путь контрольных точек PD-1, очень сильно отличается от ингибирования Т-клеток, опосредованного путем контрольной точки CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор предотвращает (полностью или частично) подавление антигеном, экспрессируемым злокачественными клетками, Т-клеточного ингибирующего сигнального каскада между злокачественной клеткой и Т-клеткой. В одном из вариантов осуществления



такой иммуностимулятор представляет собой ингибитор контрольной точки, например, ингибитор PD-1. Примеры таких иммуностимуляторов включают, например, антитела к PD-1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2. Таким образом, в одном из вариантов осуществления конъюгат суперантигена вводят с иммуностимулятором на основе PD-1, который может включать (1) молекулу (например, антитело или низкомолекулярное соединение), которая связывается с лигандом PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2), предотвращая связывание лиганда PD-1 с его когнатом PD-1 на Т-клетке, и/или (2) молекулу (например, антитело или низкомолекулярное соединение), которая связывается с PD-1 на Т-клетке, предотвращая связывание PD-лиганда, экспрессируемого представляющей интерес злокачественной клеткой.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор предотвращает (полностью или частично) подавление антигеном, экспрессируемым злокачественной клеткой, размножения, активацию и/или активность Т-клеток через опосредованный IgG4 человека (не принадлежащий человеку IgG1) путь иммунного ответа, например, а не через путь ADCC. Предусмотрено, что, хотя иммунный ответ, усиленный конъюгатом суперантигена и иммуностимулятором, может включать некоторую активность ADCC, основной компонент(ы) иммунного ответа не включает активность ADCC. В противоположность этому, некоторые из антител, используемые в настоящее время в иммунотерапии, такие как ипилимумаб (моноклональное антитело IgG1 к CTLA-4), может уничтожать клетки-мишени посредством ADCC через сигнальный каскад посредством их домена Fc посредством Fc-рецепторов на эффекторных клетках. Ипилимумаб, как многие другие терапевтические антитела, сконструировали как иммуноглобулин IgG1 человека, и хотя ипилимумаб блокирует взаимодействия между CTLA-4 и CD80 или CD86, полагают, что механизм его действия включает истощение посредством ADCC инфильтрирующие опухоли регуляторные Т-клетки, которые экспрессируют высокие уровни CTLA-4 на клеточной поверхности. (Mahoney et al. (2015) *Nature Reviews, Drug Discovery* 14: 561-584). Учитывая тот факт, что CTLA-4 экспрессируется на высоком уровне в подпопуляции Т-клеток (регуляторных Т-клетках), которые действуют, отрицательно регулируя активацию Т-клеток, то когда вводят антитело IgG1 к CTLA-4, количество регуляторных Т-клеток уменьшается за счет ADCC.

В некоторых вариантах осуществления необходимым является использование иммуностимуляторов, механизм действия которых преимущественно заключается в блокировании ингибирующих сигналов между злокачественными клетками и Т-клетками без значительного истощения популяций Т-клеток (например, позволяя популяциям Т-клеток размножаться). Для того чтобы это достичь, необходимым является использование антитела, например, антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2, которые относятся или основаны на изоформе IgG4 человека. Изоформе IgG4 человека является предпочтительным при определенных обстоятельствах, т.к. этот изоформ антитела вызывает незначительную активность ADCC или не вызывает ее по сравнению с изоформой IgG1 человека (Mahoney et al. (2015) выше). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к PD-L2 относится или основано на изоформе IgG4 человека. В результате, невозможно экстраполировать возможную терапевтическую активность антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2 с изоформой IgG4 человека на основании активности антитела с другим изоформом, например, изоформой IgG1, особенно если такое антитело направлено на отличный антиген, например, CTLA-4, такой как иммуноглобулин IgG1 человека к CTLA-4. Кроме того, CTLA-4 и PD-1 представляют собой два ингибирующих Т-клетки рецептора с независимым, статически неопределимым механизмом действия. Несмотря на их общую способность блокировать активацию Т-клеток, два белка обладают уникальными структурами и оказывают очень разное влияние на иммунные ответы против злокачественных клеток.

Иллюстративные иммуностимуляторы на основе PD-1/PD-L1 описаны в патентах США № 8728474, 8952136 и 9073994, и патенте EP № 1537878B1, и включают антитела к PD-1. Иллюстративные антитела к PD-1 включают ниволамаб (Bristol-Myers Squibb Co.), пейбролизумаб (KEYTRUDA®, Merck & Co.) и атезолизумаб (ранее известный MPDL3280A), MEDI4736, авелумаб и PDR001.

Имуностимуляторы на основе белков можно конструировать, экспрессировать и очищать с использованием способов, известных специалистам в данной области, например, как описано в настоящем описании выше. Антитела к PD-1 можно конструировать, экспрессировать, очищать, формулировать и вводить, как описано в патенты США № 8728474, 8952136 и 9073994.

Другие иммуностимуляторы (например, антитела и различные низкомолекулярные соединения) могут направлено воздействовать на пути передачи сигнала, в которых участвуют один или более следующих ниже лигандов: B7-H3 (встречается наряду с другими на клетках предстательной железы, клетке почки, немелкоклеточном раке легких, поджелудочной железы, желудка, яичника, толстой и прямой кишки); B7-H4 (встречается наряду с другими на клетках молочной железы, клетке почки, яичника, поджелудочной железы, клетках меланомы); HHLA2 (встречается наряду с другими клетках молочной железы, легкого, щитовидной железы, меланомы, поджелудочной железы, яичника, печени, мочевого пузыря, толстой кишки, предстательной железы, почки); галектины (встречаются наряду с другими на клетках немелкоклеточного рака легких, прямой и толстой кишки и желудка); CD30 (встречается наряду с другими на клетках ходжкинской лимфомы, крупноклеточной лимфомы); CD70 (встречается наряду с другими на клетках неходжкинской лимфомы, почки); ICOSL (встречается наряду с другими на клетках глиобластомы, меланомы) и CD155 (встречается наряду с другими на клетках почки, предстательной железы, под-

желудочной железы, глиобластомы). Подобным образом, другие возможные иммуностимуляторы, которые можно использовать, включают, например, агонист 4-1BB (CD137) (например, полностью принадлежащее человеку антитело IgG4 к CD137 урелумаб/BMS-663513), ингибитор LAG3 (например, гуманизованное антитело IgG4 к LAG3 LAG525, Novartis); ингибитор IDO (например, низкомолекулярное соединение INCB024360, Incyte Corporation), ингибитор TGF $\beta$ 1 (например, низкомолекулярное соединение Galunisertib, Eli Lilly) и другой рецептор или лиганды, которые встречаются на Т-клетках и/или опухолевых клетках, и которые подлежат фармацевтическому вмешательству на основании взаимодействия агонист/антагонист, а не взаимодействий посредством ADCC.

#### А. Получение антитела.

Способы получения антител известны в данной области. Например, молекулы ДНК, кодирующие переменные области легкой цепи и переменные области тяжелой цепи, можно химически синтезировать с использованием последовательностей CDR и переменные области антител представляющего интерес, например, последовательности антител, предоставленные в патенте США № 8 952136, и депонирования гибридомы, описанные в патенте США № 9073994. Синтетические молекулы ДНК можно лигировать другими подходящими нуклеотидными последовательностями, включая, например, кодирующие константную область последовательности и контролирующие экспрессию последовательности с получением общепринятых конструкций для экспрессии гена, кодирующей желаемые антитела. Получение определенных генных конструкций является рутинной в данной области. Альтернативно, предоставленные в настоящем описании последовательности можно клонировать из гибридом общепринятыми способами гибридизации или способами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием зондов синтетической нуклеиновой кислоты, последовательности которых основаны на последовательностях с информацией, предоставленной в настоящем описании, или информацией о последовательностях предшествующего уровня техники в отношении генов, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител мыши в гибридомных клетках.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, описываемые в настоящем описании, можно вводить (лигировать) в экспрессирующие векторы, которые можно вводить в клетки-хозяева общепринятыми способами трансфекции или трансформации. Иллюстративные клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, Hep G2) и миеломные клетки, которые не продуцируют иным образом белок IgG. Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в условиях, которые позволяют клеткам-хозяевам экспрессировать гены, которые кодируют переменные области легких и/или тяжелых цепей иммуноглобулина.

Конкретные условия экспрессии и очистки изменяются в зависимости от применяемой экспрессирующей системы. Например, если ген необходимо экспрессировать в *E. coli*, его сначала клонируют в экспрессирующий вектор, размещая сконструированный ген ниже подходящего бактериального промотора, например, Т<sub>р</sub> или Т<sub>ас</sub>, и прокариотической сигнальной последовательности.

Экспрессируемый секретруемый белок накапливается в преломляющих тельцах или тельцах включения, и его можно собирать после разрушения клеток прессом Френча или обработкой ультразвуком. Затем преломляющие тельца растворяют и разворачивают и расщепляют белки известными в данной области способами.

Если конструкцию ДНК, кодирующую антитело, описываемое в настоящем описании, необходимо экспрессировать в эукариотических клетках-хозяевах, например, клетках CHO, ее сначала встраивают в экспрессирующий вектор, содержащий подходящий эукариотический промотор, сигнал секреции, энхансеры IgG и различные интроны. Такой экспрессирующий вектор необязательно содержит последовательности, кодирующие полную или часть константной области, обеспечивая экспрессию полной и части тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления отдельный экспрессирующий вектор содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые необходимо экспрессировать.

Генную конструкцию можно вводить в эукариотические клетки-хозяева общепринятыми способами. Клетки-хозяева экспрессируют фрагменты V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub>, гетеродимеры V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>, одноцепочечные полипептиды V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>, завершают тяжелые или легкие цепи иммуноглобулина или их участков, каждый из которых можно присоединять к фрагменту с другой функцией (например, цитотоксичность). В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина трансфицируют одним вектором, экспрессирующим полипептид, экспрессирующий полную тяжелую цепь или ее часть (например, переменную область тяжелой цепи) или полную легкую цепь или ее часть (например, переменную область легкой цепи). В других вариантах осуществления клетку-хозяина трансфицируют одним вектором, кодирующим (а) полипептид, содержащий переменную область тяжелой цепи, и полипептид, содержащий переменную область легкой цепи, или (б) полную тяжелую цепь иммуноглобулина и полную легкую цепь иммуноглобулина. В других вариантах осуществления клетку-хозяина котрансфицируют более чем одним экспрессирующим вектором (например, одним экспрессирующим вектором, экспрессирующим полипептид, содержащий всю или часть тяжелой цепи или переменной области тяжелой цепи, и другим экспрессирующим вектором, экспрессирующим полипептид, содержащим всю или часть легкой цепи или переменной области легкой цепи).

Способ получения полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, или полипептида, содержащего вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина, может включать рост (культивирование) клетки-хозяина, трансфицированной экспрессирующим вектором, в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, или полипептида, содержащего вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, или полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи, затем можно очищать с применением способов, хорошо известных в данной области, например, аффинной метки, такой как глутатион-S-трансфераза (GST), и гистидиновой метки.

Способ получения моноклонального антитела, которое связывается с белком-мишенью, например, PD-1, PD-L1 или PD-L2, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, может включать рост клетки-хозяина, трансфицированной: (а) экспрессирующим вектором, кодирующим полную или неполную тяжелую цепь иммуноглобулина, и отдельным экспрессирующим вектором, кодирующим полную или неполную легкую цепь иммуноглобулина; или (b) одним экспрессирующим вектором, кодирующим обе цепи (например, полные или неполные цепи), в условиях, которые обеспечивают экспрессию обеих цепей. Интактное антитело (или антигенсвязывающ фрагмент) можно собирать и очищать с применением способов, хорошо известных в данной области, например, белок А, белок G, аффинные метки, такие как глутатион-S-трансфераза (GST), и гистидиновые метки. Специалисту в данной области известно, как экспрессировать тяжелую цепь и легкую цепь из одного экспрессирующего вектора или из двух отдельных экспрессирующих векторов.

#### В. Модификации антитела.

Способы снижения или устранения антигенности антител и фрагментов антител известны в данной области. В случае, когда антитела предназначены для ввода человеку, антитела предпочтительно "гуманизируют" для снижения или устранения антигенности у людей. Предпочтительно, гуманизированное антитело обладает такой же или по существу такой же аффинностью к антигену как негуманизированное антитело мышь, из которого его получили.

В одном из подходов гуманизации получают химерные белки, в которых константные области иммуноглобулинов мыши заменяют константными областями иммуноглобулинов человека. См., например, Morrison et al. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; патенты США № 6893625 (Robinson), 5500362 (Robinson) и 4816567 (Cabilly).

В подходе, известном как пересадка CDR, CDR вариабельных областей легких и тяжелых цепей пересаживают в каркасы от других видов. Например, CDR мышей можно пересаживать в FR человека. В некоторых вариантах осуществления CDR вариабельных областей легкой и тяжелой цепей антитела к ErbB3 пересаживают в FR человека или консенсус FR человека. Для получения консенсуса FR человека, FR от нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи человека выравнивают для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. Пересадка CDR описана в патентах США № 7022500 (Queen), 6982321 (Winter), 6180370 (Queen), 6054297 (Carter), 5693762 (Queen), 5859205 (Adair), 5693761 (Queen), 5565332 (Hoogenboom), 5585089 (Queen), 5530101 (Queen), Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525, Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327, Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536 и Winter (1998) FEBS Lett 430: 92-94.

В подходе, называемом "SUPERHUMANIZATION™" последовательности CDR человека выбирают из генов зародышевой линии человека на основании структурного сходства CDR человека с CDR антитела мыши, которое необходимо гуманизировать. См., например, патент США № 6881557 (Foote) и Tan et al. (2002) J. Immunol. 169:1119-1125.

Другие способы уменьшения иммуногенности включают "реконструирование", "избыточная химеризация" и "винирование/изменение поверхности". См., например, Vaswami et al. (1998) Annals of Allergy, Asthma, & Immunol. 81:105; Roguska et al. (1996) Prot. Engineer 9:895-904 и патент США № 6072035 (Hardman). В подходе винирования/изменения поверхности доступные на поверхности аминокислотные остатки в антителе мыши заменяют аминокислотными остатками чаще встречающимися в тех же положениях в антителе человека. Этот тип изменения поверхности антитела описан, например, в патенте США № 5639641 (Pedersen).

Другой подход преобразования антитела мыши в форму, подходящую для медицинского использования у людей, известен как технология ACTIVMAV™ (Vaccinex, Inc., Rochester, NY), которая включает вектор на основе вируса осповакцины для экспрессии антител в клетках млекопитающих. Указано, что можно получать высокие уровни of комбинаторного разнообразия тяжелых и легких цепей IgG. См., например, патенты США № 6706477 (Zauderer), 6800442 (Zauderer) и 6872518 (Zauderer).

Другой подход преобразования антитела мыши в форму, пригодную для использования у людей, представляет собой технологию, коммерчески используемую KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA). Эта технология предусматривает использование запатентованной библиотеки "акцепторов" человека для получения библиотеки "целевых эпитопов" для выбора антитела.

Другой подход модификации антитела мыши в форму, подходящую для медицинского использова-

ния у людей представляет собой технологию HUMAN ENGINEERING™, которую использует на коммерческой основе XOMA (US) LLC. См., например, публикация PCT № WO 93/11794 и патенты США № 5766886, 5770196, 5821123 и 5869619.

Любой подходящий подход, включая любой из указанных выше подходов, можно использовать для снижения или устранения иммуногенности антитела у человека, включая связывание компонента фрагмента конъюгата суперантигена, описываемого в настоящем описании.

Способы получения полиспецифических антител известны в данной области. Полиспецифические антитела включают биспецифические антитела. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела связываются с двумя различными эпитопами представляющего интерес антигена. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела и диатела F(ab')<sub>2</sub>), как описано, например, у Milstein et al., *Nature* 305:537-539 (1983), WO 93/08829, Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991), WO 94/04690, Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology* 121:210, WO96/27011, Brennan et al. (1985) *Science* 229: 81, Shalaby et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-225, Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148 (5) :1547-1553, Hollinger et al. (1993) *PNAS*, 90:6444-6448, Gruber et al. (1994) *J. Immunol.* 152:5368, Wu et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25(11): 1290-1297, в патентной публикации США № 2007/0071675 и Bostrom et al., *Science* 323:1640-1644 (2009).

#### IV. Составы и фармацевтические композиции.

Конъюгат суперантигена и иммуностимулятора можно вводить пациенту совместно, последовательно или периодически, чтобы лечить злокачественную опухоль, например, замедлять скорость роста злокачественных клеток, снижать частоту возникновения или количество метастазов, уменьшать размер опухоли, ингибировать рост опухоли, уменьшать кровоснабжение опухоли или злокачественных клеток, способствовать иммунному ответу против злокачественных клеток или опухоли, предотвращать или ингибировать прогрессирование злокачественной опухоли, например, по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100%. Альтернативно, конъюгат суперантигена и иммуностимулятор можно вводить пациенту совместно, последовательно или периодически, чтобы лечить злокачественную опухоль, например, увеличивать продолжительность жизни пациента с злокачественной опухолью, например, на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 1 год, 5 лет или 10 лет.

Конъюгат суперантигена и иммуностимулятор можно формулировать отдельно или друг с другом с применением способов, известных специалистам в данной области. Например, для терапевтического использования конъюгат суперантигена и/или иммуностимулятор объединяют с фармацевтически приемлемым носителем. Как используют в настоящем описании, "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и эксципиенты, пригодные для использования при контакте с тканями людей и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений в соответствии с обоснованным отношением польза/риск. Носитель(и) должны являться "приемлемыми" в том смысле, что являются совместимыми с другими ингредиентами состава и не являются вредными для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, диспергирующие среды, покрытия, изотонические и замедляющие высвобождение средства и т.п., которые являются совместимыми с фармацевтическим введением. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области.

Фармацевтические композиции, содержащие суперантиген и/или иммуностимулятор, описываемый в настоящем описании, можно предоставлять в одной лекарственной форме или различных лекарственных формах. Фармацевтическая композиция или композиции необходимо формулировать так, чтобы они являлись совместимыми с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения представляют собой внутривенное (в/в), внутримышечное, внутрикожное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение. Альтернативно, средства можно вводить местно, а не системно, например, посредством инъекции средства или средств непосредственно в участок действия, часто в депо или состав с длительным высвобождением.

Пригодные составы можно получать способами, хорошо известными в фармацевтической области. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты состава, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как EDTA; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства придания тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Носитель должен являться стабильным в условиях производства и хранения, и должен быть защищен от действия микроорганизмов. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полнол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий

полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Фармацевтические составы предпочтительно являются стерильными. Стерилизацию можно проводить, например, фильтрованием через стерильные фильтрационные мембраны. В случае, когда композицию лиофилизируют, стерилизацию фильтрованием можно проводить до или после лиофилизации и восстановления.

Объединенные конъюгат суперантигена и иммуностимулятор по настоящему изобретению можно применять отдельно или в сочетании с другими соединениями, такими как носители или другие терапевтические соединения. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество одного или более конъюгатов суперантигена и одного или более иммуностимуляторов, например, антитела к PD-1, и также могут содержать дополнительные средства, растворенные или диспергированные в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы "фармацевтически" или "фармакологически приемлемые" относятся к веществам, например, композициям, которые не вызывают неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при введении млекопитающему, такому как, например, человек. Получение фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один конъюгат суперантигена и иммуностимулятор, известно специалистам в данной области в свете настоящего описания и как проиллюстрировано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed. Mack Printing Company, 1990, включенном в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, для введения человеку следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как требует FDA Office of Biological Standards.

В конкретном варианте осуществления изобретения композиции по изобретению содержат направленный на опухоль суперантиген в комбинации с иммуностимулятором. Такие комбинации включают, например, любой направленный на опухоль суперантиген и/или иммуностимулятор, как описано в настоящем описании.

В конкретном варианте осуществления изобретения направленный на опухоль суперантиген содержит бактериальный суперантиген, включая, но, не ограничиваясь ими, стафилококковый энтеротоксин (SE), стрептококковый пирогенный экзотоксин (SPE), токсин синдрома токсического шока *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE), конъюгированный с направляющим фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения композиции содержат направленные на опухоль суперантигены, содержащие суперантигены со следующими номерами доступа Protein Data Bank и/или GenBank, включают, но не ограничиваются ими, SEE представляет собой P12993; SEA представляет собой P013163; SEB представляет собой P01552; SEC1 представляет собой P01553; SED представляет собой P20723; и SEN представляет собой AAA19777, а также их варианты, конъюгированные с направляющим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена содержит последовательность суперантигена дикого типа или сконструированную последовательность суперантигена, такую как, последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2), любую из которых можно модифицировать таким образом, чтобы аминокислоты в любой из идентифицируемых областей А-Е (см., фиг. 2) заменяют другими аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления суперантиген, встроенный в конъюгат, представляет собой SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3) или SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 4).

Конкурентные примеры направляющих фрагментов, которые следует конъюгировать с суперантигенами, включают, например, любую молекулу, которая способна связываться с клеточной молекулой и предпочтительно характерной для заболевания молекула, такой как специфическая молекула злокачественной клетки. Направляющий фрагмент можно выбирать из антител, включая антигенсвязывающие фрагменты, растворимые Т-клеточные рецепторы, факторы роста, интерлейкины, гормоны и т.д. Иллюстративные направление на злокачественную опухоль антитела сап включают, но не ограничиваются ими, антитела к CD19, антитела к CD20, антитела к 5T4, антитела к Ер-СAM, антитела к Her-2/неу, антитела к EGFR, антитела к CEA, антитела к специфическому мембранному антигену предстательной железы (PSMA) и антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления суперантиген можно конъюгировать с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см., WO8907947) или C242Fab (см., WO9301303).

Примеры таких направленных на опухоль суперантигенов включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7). В предпочтительном варианте осуществления конъюгат суперантигена представляет собой 5T4 Fab-SEA/E-120, известный в данной области как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA®, который содержит две полипептидные последовательности, которые совместно определяют фрагмент Fab антитела к 5T4, где одна из полипептидных последовательностей дополнительно содержит суперантиген SEA/E-120, а именно SEQ ID NO: 8 (химерную цепь V<sub>H</sub> Fab 5T4, связанную линкером длиной три аминокислоты с SEA/E-120) и SEQ ID NO: 9 (химерную цепь V<sub>L</sub> Fab 5T4).

В предпочтительном варианте осуществления композиции по изобретению содержат направленный на опухоль суперантиген 5T4Fab-SEA/E-120, известный в данной области как наптумомаб

эстафенатокс/ANYARA®), в комбинации с ингибитором PD-1, таким как антитело к PD-1, например, ниволумаб (Bristol-Myers Squibb Co.), пейбролизумаб (KEYTRUDA®, Merck & Co.), МК-3475 (Merck & Co), пидлизумаб (CureTech), AMP-224 (AstraZeneca/Medimmune) и AMP-514 (AstraZeneca/Medimmune), или антитело к PD-L1, такое как MPDL3280A (Genentech/Roche), MEDI-4736 (AstraZeneca/Medimmune) и MSB0010718C (EMD Serono/Merck KGA).

В конкретном варианте осуществления изобретения композиции содержат направленный суперантиген наптумомаб эстафенатокс (ANYARA®) в комбинации с одним или более антител к PD-1, включая ниволумаб (Bristol-Myers Squibb Co.), пейбролизумаб (KEYTRUDA®, Merck & Co.), атезолизумаб (ранее известный как MPDL3280A), MEDI4736, авелумаб и PDR001.

Составы или лекарственная форма, содержащая конъюгат суперантигена и иммуностимулятор, может содержать различные типы носителей в зависимости от того, следует ли их вводить в твердой, жидкой форме или в форме аэрозоля, и необходимо ли их стерилизовать для таких путей введения в виде инъекции.

Примеры носителей или разбавителей включают жиры, масла, воду, солевые растворы, липиды, липосомы, смолы, связывающие средства, наполнители и т.п. или их сочетания. Композиция также может содержать различные антиоксиданты для предотвращения окисления одного или более компонентов. Кроме того, предотвратить действие микроорганизмов можно путем добавления консервантов, таких как различные антибактериальные и противогрибковые средства, включая, но, не ограничиваясь ими парабе-ны (например, метилпарабены, пропилпарабены), хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал или их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере приблизительно 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может содержаться приблизительно от 2% до приблизительно 75% единиц массы, или приблизительно от 25% до приблизительно 60%, например, и любой диапазон, получаемый из них. Специалисты в данной области получения таких фармацевтических составов будут учитывать факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок годности, а также другие фармакологические факторы, и поскольку необходимым может являться различные дозирования и схемы лечения. Такие определения известны и используются специалистам в данной области.

Активные средства вводят в количестве или количествах, эффективных для снижения, уменьшения, ингибирования или иным образом подавления роста или пролиферации злокачественных клеток, индукции апоптоза, ингибирования ангиогенеза злокачественной опухоли или опухоли, ингибирования метастазов или индукции цитотоксичности в клетках. Эффективное количество активного соединения(й), используемое для осуществления настоящего изобретение для терапевтического лечения злокачественной опухоли, изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья пациента. Эти термины включают синергические состояния, такие как состояния, представленные и описанные в настоящем изобретении, где одно средство отдельно, такое как конъюгат суперантигена или иммуностимулятор, такой как антитело к PD-1, может действовать слабо или не действовать совсем, но когда их объединяют друг с другом, например, но не ограничиваясь этим, посредством последовательного дозирования, два или более средств действуют с получением синергического эффекта.

В определенных неограничивающих примерах доза конъюгата суперантигена также может содержать приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 5 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 10 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 15 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 20 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 200 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 350 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 500 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно 1 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 5 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 10 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 50 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 100 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 200 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 350 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно 500 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно до 1000 мг/кг/массы тела или более на введение и любой диапазон, получаемый из приведенных значений. В неограничивающих примерах диапазона, получаемого из перечисленных в настоящем описании чисел диапазон приблизительно от 5 мг/кг/массы тела приблизительно до 100 мг/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 500 миллиграмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 миллиграмм/кг/массы тела. Другие иллюстративные диапазоны доз можно вводить диапазоне приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 1000 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 75 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 40 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 30 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 20 микро-

грамм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 15 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 1 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 10 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 1000 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 75 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 40 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 30 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 20 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 15 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 5 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 10 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 1000 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 75 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 40 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 30 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 20 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 10 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 15 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 1000 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 75 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 40 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 30 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 15 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 20 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 1000 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 100 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 75 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 50 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 40 микрограмм/кг/массы тела, приблизительно от 20 микрограмм/кг/массы тела приблизительно до 30 микрограмм/кг/массы тела и т.д., на основании чисел, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления, например, но, не ограничиваясь этим, введение конъюгата суперантигена, эффективное количество или доза конъюгата суперантигена, которую вводят, представляет собой количество в диапазоне от 0,01 до 500 мкг/кг массы тела пациента, например, 0,1-500 мкг/кг массы тела пациента и, например, 1-100 мкг/кг массы тела пациента.

Предполагают, что эффективное количество или доза иммуностимулятора, которую вводят в комбинации с конъюгатом суперантигена, представляет собой дозу, которая приводит по меньшей мере к аддитивному, но предпочтительно синергическому противоопухолевому действию и не препятствует или не ингибирует усиление иммунной системы или активации Т-клеток. Если иммуностимулятор вводят одновременно с конъюгатом суперантигена, то иммуностимулятор можно вводить в низкой дозе, чтобы он не нарушал механизм действия конъюгата суперантигена.

Как правило, терапевтически эффективное количество иммуностимулятора, например, антитела к PD-1, 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. Например, пейбролизумаб (KEYTRUDA®) можно вводить периодически в дозе 2 мг/кг в виде внутривенной инфузии. Количество вводимого иммуностимулятора зависит от таких переменных, как тип и тяжесть заболевания или показания, подлежащего лечению, общего состояния здоровья пациента, активности конъюгата суперантигена и иммуностимулятор *in vivo*, фармацевтического состава и пути введения. V. Схемы лечения и показания

Схемы лечения также могут изменяться и, как правило, зависят от типа опухоли, локализации опухоли, прогрессирования заболевания и состояния здоровья и возраста пациента. Для определенных типов опухоли могут требоваться более агрессивные протоколы лечения, но в то же время, пациенты могут быть неспособны переносить более агрессивные схемы лечения. Часто клиницист может лучше всего подходить для принятия таких решений на основании его или ее опыта в данной области и известной эффективности и токсичности (в случае ее наличия) терапевтических составов.

В конкретном варианте осуществления изобретения способы лечения по изобретению включают введение направленного на опухоль суперантигена в комбинации с иммуностимулятором нуждающемуся в этом пациенту, например, пациенту со злокачественной опухолью. Такие виды комбинированного лечения включают, например, введение любого направленного на опухоль суперантигена и/или иммуностимулятора, как описано в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления изобретения направленный на опухоль суперантиген содержит бактериальный суперантиген, включая, но, не ограни-

чиваясь ими, стафилококковый энтеротоксин (SE), стрептококковый пирогенный экзотоксин (SPE), токсин синдрома токсического шока *Staphylococcus aureus* (TSST-1), стрептококковый митогенный экзотоксин (SME), стрептококковый суперантиген (SSA), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB) и стафилококковый энтеротоксин Е (SEE), конъюгированный с направляющим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат суперантигена содержит последовательность суперантигена дикого типа или сконструированную последовательность суперантигена, такую как, последовательность SEE дикого типа (SEQ ID NO: 1) или последовательность SEA дикого типа (SEQ ID NO: 2), любую из которых можно модифицировать таким образом, что аминокислоты в любой из определенных областей А-Е (см., фиг. 2) замещают другими аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления суперантиген, встроенный в конъюгат, представляет собой SEA/E-120 (SEQ ID NO: 3) или SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 4).

Конкретные примеры направляющих фрагментов, которые конъюгируют с суперантигенами, включают, например, любую молекулу, которая способна связываться с клеточной молекулой и предпочтительно является характерной для заболевания молекулой, такой как специфическая для злокачественной клетки молекула. Направляющий фрагмент можно выбирать из антител, включая антигенсвязывающие фрагменты, растворимые Т-клеточные рецепторы, факторы роста, интерлейкины, гормоны и т.д. Иллюстративные направленные на злокачественную опухоль антитела могут включать, но не ограничиваться ими, антитело к CD19, антитела к CD20, антитела к 5T4, антитела к Еp-CAM, антитела к Her-2/неu, антитела к EGFR, антитела к СЕА, антитела к специфическому мембранному антигену предстательной железы (PSMA) и антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления суперантиген можно конъюгировать с иммунологически реактивным фрагментом антитела, таким как C215Fab, 5T4Fab (см., WO8907947) или C242Fab (см., WO9301303).

Примеры таких направленных на опухоль суперантигенов включают C215Fab-SEA (SEQ ID NO: 5), 5T4Fab-SEA<sub>D227A</sub> (SEQ ID NO: 6) и 5T4Fab-SEA/E-120 (SEQ ID NO: 7). В предпочтительном варианте осуществления конъюгат суперантигена представляет собой 5T4 Fab-SEA/E-120, известный в данной области как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA®, который содержит две полипептидные последовательности, которые совместно определяют фрагмент Fab антитела к 5T4, где одна из полипептидных последовательностей дополнительно содержит суперантиген SEA/E-120, а именно SEQ ID. NO: 8 (химерную цепь V<sub>H</sub> Fab 5T4, связанную линкером длиной три аминокислоты с SEA/E-120) и SEQ ID. NO: 9 (химерную цепь V<sub>L</sub> Fab 5T4).

В предпочтительном варианте осуществления композиции по изобретению содержат направленный на опухоль суперантиген 5T4Fab-SEA/E-120, известный в данной области как наптумомаб эстафенатокс/ANYARA® в комбинации с ингибитором PD-1, таким как антитело к PD-1, например, ниволумаб (Bristol-Myers Squibb Co.), пейбролизумаб (KEYTRUDA®, Merck & Co.), МК-3475 (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), AMP-224 (AstraZeneca/Medimmune) и AMP-514 (AstraZeneca/Medimmune) или антитело к PD-L1, такое как MPDL3280A (Genentech/Roche), MEDI-4736 (AstraZeneca/Medimmune) и MSB0010718C (EMD Serono/Merck KGA).

В конкретном варианте осуществления изобретения композиции содержат направленный суперантиген наптумомаб эстафенатокс (ANYARA®) в комбинации с одним или более антителами к PD-1, включая ниволумаб (Bristol-Myers Squibb Co.), пейбролизумаб (KEYTRUDA®, Merck & Co.), атезолизумаб (ранее известный как MPDL3280A), MEDI4736, авелумаб и PDR001.

Кроме того, конъюгат суперантигена и иммуностимулятор можно вводить друг с другом или последовательно совместно с одним или более дополнительными средствами, которые усиливают активность и/или селективность терапевтического эффекта. Такие средства включают, например, кортикостероиды, дополнительные иммуномодуляторы, и такие соединения, сконструированные, для снижения возможной иммунореактивности пациента к вводимому конъюгату суперантигена. Например, иммунореактивность к вводимому суперантигену можно уменьшать путем введения совместно, например, с антителом к CD20 и/или антителом к CD19, которое снижает образование антител к суперантигену у пациента.

Предпочтительно пациенты, подлежащие лечению, имеют соответствующую функцию костного мозга (определяемую как абсолютное число гранулоцитов в периферической крови >2000/мм<sup>3</sup> и число тромбоцитов 100000/мм<sup>3</sup>), соответствующую функцию печени (билирубин <1,5 мг/дл) и соответствующую функцию печени (креатинин <1,5 мг/дл).

В некоторых вариантах осуществления схема лечения по настоящему изобретению может включать приведение неоплазии или опухолевых клеток в контакт с конъюгатом суперантигена и иммуностимулятором одновременно. Это можно получать путем приведения клетки в контакт с одной композицией или фармакологическим составом, который содержит оба средства, или путем приведения клетки в контакт с двумя отдельными композициями или составами, одновременно, где одна композиция содержит конъюгат суперантигена, а другая содержит иммуностимулятор.

Альтернативно, конъюгат суперантигена может предшествовать или следовать после иммуности-



мулятора с интервалами в диапазоне от минуты, суток до недель. В вариантах осуществления, где другой иммуностимулятор и конъюгат суперантигена применяют раздельно к клетке, следует обеспечить, чтобы не проходил значительный промежуток времени между временем каждой доставки, так что конъюгат суперантигена и иммуностимулятор все еще являлись способными оказывать преимущественно комбинированное действие на клетку. В таких случаях, предусмотрено, что клетку можно приводить в контакт с обоими вариантами лечения приблизительно через 12-72 ч после друг друга. В некоторых ситуациях желательным может являться значительное увеличение периода времени для лечения, однако когда между соответствующими введениями заканчиваются от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Можно применять различные комбинации, где конъюгат суперантигена является "А", и иммуностимулятор является "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.

Кроме того, предполагают, что настоящее изобретение можно использовать в сочетании с хирургическим вмешательством. В случае хирургического вмешательства настоящее изобретение можно использовать до операции, например, для удаления неоперабельной опухоли, подлежащей резекции. Альтернативно, настоящее изобретение можно использовать во время хирургической операции и/или после нее для лечения остаточного или метастатического заболевания. Например, в ложе опухоли после проведенной резекции можно инъецировать или перфузировать составом, содержащим направленный на опухоль суперантиген и/или иммуностимулятор. Перфузия может продолжаться после резекции, например, в результате того, что оставляют катетер, имплантированный в участок хирургической операции. Также предполагают периодическое послеоперационное лечение. Любая комбинация терапии по изобретению с хирургической операцией входит в объем изобретения.

При необходимости также можно проводить непрерывное введение, например, когда опухоль иссекают и обрабатывают ложе опухоли для удаления остаточного, видимого под микроскопом заболевания. Предпочтительной является доставка посредством шприца или катетеризации. Такую непрерывную перфузию можно проводить в течение периода приблизительно 1-2 ч, приблизительно 2-6 ч, приблизительно 6-12 ч, приблизительно 12-24 ч, приблизительно 1-2 суток, приблизительно 1-2 недели или дольше после начала лечения. Как правило, доза терапевтической композиции при непрерывной перфузии будет эквивалентной дозе, получаемой посредством однократной или многократных инъекций, скорректированной в течение период времени, во время которого проводят перфузию. Дополнительно предусматривают, что для введения терапевтических композиций по настоящему изобретению можно использовать перфузию конечности, в частности при лечении меланомы и саркомы.

Характерный курс лечения для первичной опухоли или ложа опухоли после резекции может включать многократные дозирования. Характерное лечение первичной опухоли может включать применение 6 доз в течение периода продолжительностью две недели. Двух недельную схему лечения можно повторять один, два, три, четыре, пять, шесть или более раз. Во время курса лечения может быть пересмотрена необходимость завершения запланированных доз.

Иммунотерапия конъюгатом суперантигена часто приводит к быстрой (в течение часов) и мощной поликлональной активации Т-лимфоцитов. Цикл лечения конъюгатом суперантигена может включать от 4 до 5 внутривенных инъекций конъюгата суперантигена в сутки. Такие циклы лечения можно проводить с интервалами, например, от 4 до 6 недель. Воспаление с инфильтрацией СТЛ в опухоль является одним из основных эффекторов противоопухолевых терапевтических суперантигенов. После короткого периода массовой активации и дифференцировки СТЛ Т-клеточный ответ быстро снижается (в течение 4-5 суток) до исходных уровней. Таким образом, период пролиферации лимфоцитов, во время которого цитостатические лекарственные средства могут нарушать лечение суперантигеном является коротким и четко определенным. Только с терапией суперантигеном/иммуностимулятором по настоящему изобретению такой определенный период времени для активности является достоверным, таким образом, обеспечивая новое комплексное лечение на основе цитостатического средства в высокой дозе/иммунотерапии.

Предусмотрено, что ряд злокачественных опухолей можно лечить способами и композициями, описываемыми в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, первичную или метастатическую меланому, аденокарциному, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную аденокарциному, тиому, лимфому, саркому, рак легких, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак толстого кишечника, множественную миелому, нейробластому, NPC, рак мочевого пузыря, рак шейки матки и т.п.

Кроме того, злокачественная опухоль, которую можно лечить способами и композициями, описываемыми в настоящем описании, в зависимости от расположения в организме и/или системы, подлежащей лечению, может представлять собой, без ограничения, рак кости (например, опухоли семейства

Юинга, остеосаркому); рак головного мозга (например, рак головного мозга взрослых, (например, рак головного мозга взрослых, глиому ствола головного мозга (детский возраст), церебральную астроцитому (детский возраст), церебральную астроцитому/злокачественную глиому (детский возраст), эпендимому (детский возраст), медуллобластому (детский возраст), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому (детский возраст), глиому зрительных нервов и гипоталамической области (детский возраст) и рак головного мозга детского возраста (другой)); рак молочной железы (например, рак молочной железы у женщин или у мужчин); рак пищеварительной системы/желудочно-кишечный рак (например, рак ануса, рак желчных протоков (внепеченочный), карциноидную опухоль (желудочно-кишечную), рак толстого кишечника, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак печени (взрослого возраста первичный), рак печени (детский возраст), рак поджелудочной железы, рак тонкого кишечника, рак желудка (желудочный)); эндокринные злокачественные опухоли (например, аденокортикальную карциному, карциноидную опухоль (желудочно-кишечную), карциному островковых клеток (эндокринную поджелудочной железы), парарак щитовидной железы, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак щитовидной железы); рак глаз (например, меланому (внутриглазную), ретинобластому); урогенитальный рак (например, рак мочевого пузыря, рак почки (почечноклеточный), рак полового члена, рак предстательной железы, рак почечной лоханки и рак мочеточника (переходноклеточный), рак яичка, рак мочеиспускательного канала, опухоль Вильмса и другие опухоли почки детского возраста); эмбрионально-клеточный рак (например, экстракраниальную герминогенную опухоль (детский возраст), внегонадную герминогенную опухоль, герминогенную опухоль яичника, рак яичка); гинекологический рак (например, рак шейки матки, рак эндометрия, гестационную трофобластическую опухоль, эпителиальный рак яичников, герминогенную опухоль яичника, опухоль яичников с низким потенциалом, саркому матки, рак влагалища, рак женских наружных половых органов); рак головы и шеи (например, гипофарингиальный рак, рак гортани, рак губы и полости рта, метастатический плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения, рак носоглотки, рак ротоглотки, рак околоносовых пазух и полости носа, парарак щитовидной железы, рак слюнных желез); рак легких (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких); лимфому (например, СПИД-ассоциированная лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина (взрослый возраст), лимфому Ходжкина (детский возраст), лимфому Ходжкина во время беременности, грибовидный микоз, неходжкинскую лимфому (взрослый возраст), неходжкинскую лимфому (детский возраст), неходжкинскую лимфому во время беременности, первичную лимфому центральной нервной системы, синдром Сезари, Т-клеточную лимфому (кожи), макроглобулинемию Вальденстрема); скелетно-мышечный (например, опухоли семейства Юинга, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рабдомиосаркому (детский возраст), саркому мягких тканей (взрослый возраст), саркому мягких тканей (детский возраст), саркому матки); неврологический (например, опухоль головного мозга взрослого возраста, опухоль головного мозга детского возраста (например, глиому ствола головного мозга, церебральную астроцитому, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, глиому зрительных нервов и гипоталамической области, другие опухоли головного мозга), нейробластому, первичную гипофизарную лимфому центральной нервной системы); дыхательный/грудной (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, злокачественную мезотелиому, тиому и карциному тимуса) и кожи (например, Т-клеточную лимфому кожи, саркому Капоши, меланому и рак кожи).

Следует понимать, что способ можно использовать для лечения ряда злокачественных опухолей, например, злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака желудка, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака и рака кожи.

Еще дополнительно злокачественная опухоль может включать опухоль, состоящую из опухолевых клеток. Например, опухолевые клетки могут включать, но не ограничиваются ими, клетку меланомы, клетку рака мочевого пузыря, клетку рака молочной железы, клетку рака легкого, клетку рака толстого кишечника, клетку рака предстательной железы, клетку рака печени, клетку рака поджелудочной железы, клетку рака желудка, клетку рака яичек, 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 по изобретению, включают такие саркомы и карциномы, как, но, не ограничиваясь ими: фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному слюнных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллоб-

ластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, неврому слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластоме и ретинобластоме.

#### VI. Наборы.

Кроме того, изобретение относится к наборам, содержащим, например, первый контейнер, содержащий конъюгат суперантигена, и второй контейнер, содержащий иммуностимулятор, такой как антитело к PD-1. Такой набор также может содержать дополнительные средства, такие как, например, кортикостероид или другой липидный модулятор. Средство контейнера само по себе может быть шприцем, пипеткой и/или другим подобным устройством, из которого состав можно наносить на конкретные участки организма, инъектировать животному и/или наносить и/или смешивать с другими компонентами набора.

Наборы могут содержать подходящим образом разделенный на аликвоты конъюгат суперантигена и/или иммуностимулятор и необязательно липид и/или дополнительное средство композиции по настоящему изобретению. Компоненты наборов можно упаковывать в водные среды или в лиофилизированной форме. Когда компоненты набора предоставлены в одном и/или более жидких растворах, жидкий раствор представляет собой стерильный водный раствор.

Практическое осуществление изобретения будет более полно понятно из указанных выше примеров, которые приведены в настоящем описании исключительно с иллюстративными целями, и их не следует истолковывать как ограничивающие изобретение каким-либо образом.

#### Примеры

Пример 1. Комбинированное лечение ANYARA® и ингибитором антитела к PD-1 против линии опухолевых клеток NSCLC

В этом примере описано исследование *in vitro* тестирования действия против злокачественной опухоли комбинации направленного на опухоль суперантигена, ANYARA® и антитела к PD-1, KEYTRUDA® против линии опухолевых клеток немелкоклеточного рака легких (NSCLC) HCC827.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от здоровых доноров инкубировали в течение 4 суток с 10 нг/мл стафилококкового энтеротоксина А (SEA). Затем выделяли Т-клетки и инкубировали с IL-2 еще в течение 1 суток.  $1 \times 10^4$  клеток HCC827 на лунку инкубировали в 96-луночных планшетах в течение 1 ч с Т-клетками и KEYTRUDA® в концентрации 0,2 мг/мл. Отношение эффектор:мишень (Т-клетки:клетки HCC827) составляло 8:1. Через 1 ч инкубации с KEYTRUDA® или без них, в лунки добавляли ANYARA® в различных концентрациях (0, 0,1 мг/мл, и 10 мг/мл) и инкубировали планшеты дополнительно 48 ч. В конце обработки культуральный супернатант удаляли, включая суспендированные Т-клетки и опухолевые клетки, и отмывали прикрепленные опухолевые клетки один раз средой для культивирования. Жизнеспособность оставшихся HCC827 тестировали с использованием набора CCK8 (Cell Counting Kit-8, Sigma Aldrich) по протоколу производителя. Жизнеспособность контрольной группы нормализовали на 100%. Жизнеспособность злокачественных клеток (%)=(значение OD группы обработки/значение OD контрольной группы) $\times$ 100.

Как показано на фиг. 4 и фиг. 5, комбинация ANYARA® с KEYTRUDA® обладала наибольшим эффектом по отношению к жизнеспособности клеток HCC827. Хотя один ANYARA® в обеих концентрациях снижал жизнеспособность клеток HCC827, он являлся гораздо менее эффективным по сравнению с комбинацией ANYARA® с KEYTRUDA®. KEYTRUDA® в тестируемой концентрации 0,2 мг/мл не оказывал эффекта на жизнеспособность злокачественных клеток. ANYARA® в более низкой концентрации 0,1 мг/мл уменьшал жизнеспособность клеток HCC827 до  $60 \pm 9,4\%$  ( $p < 0,05$  в сравнении с контролем), тогда как комбинация ANYARA® с KEYTRUDA® снижала жизнеспособность клеток до  $33 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,005$  в сравнении с контролем;  $p < 0,05$  в сравнении с ANYARA®) (фиг. 4). ANYARA® в более высокой концентрации (10 мг/мл) имел более выраженный эффект, чем при более низкой концентрации, снижая жизнеспособность злокачественных клеток до  $40 \pm 6,6\%$  ( $p < 0,005$  в сравнении с контролем), однако также в этой концентрации комбинация ANYARA® с KEYTRUDA® являлась значительно более эффективной и снижала жизнеспособность клеток до  $14 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,0005$  в сравнении с контролем;  $p = 0,005$  в сравнении с ANYARA®) (фиг. 5).

В совокупности эти результаты демонстрируют синергическое действие иммуностимулятора антитела к PD-1 (KEYTRUDA®) с направленным на опухоль суперантигеном (ANYARA®) и поддерживают концепцию, что введение направленного на злокачественную опухоль суперантигена совместно с иммуностимулятором может приводить к усиленному действию против злокачественной опухоли, который является больше, чем аддитивное действие каждого средства при введении отдельно.

Пример 2. Комбинированное лечение направленным на опухоль суперантигеном и ингибитором антитела к PD-1 мыши на модели Меланомы B16 на мышцах.

В этом примере описано исследование тестирования эффекта направленного на опухоль суперантигена C215Fab-SEA и антитела к PD-1 мыши на модели меланомы B16-EpCAM на мышцах *in vivo*. Комбинированное лечение направленного на опухоль суперантигена и антитела к PD-1 тестировали на модели сингенной опухоли с использованием клеток низко иммуногенной меланомы B16, трансфицированных антигеном карциномы толстой кишки человека EpCAM, который распознается антителом к C215. На-

направленный на опухоль суперантиген C215Fab-SEA представляет собой слит белок, который содержит опухолерективные mAb (C215Fab) и бактериальный суперантиген стафилококковый энтеротоксин А (SEA). C215Fab-SEA использовали вместо ANYARA® для облегчения экспериментов на мышах *in vivo*.

Для исследования мышам C57B1/6 инокулировали внутривенно (в/в)  $1,75 \times 10^5$  клеток меланомы B16-ЕрСАМ в хвостовую вену для индукции опухолей в легких. Мыши обрабатывали на сутки 5-8 ежедневной в/в инъекцией C215Fab-SEA (0,5 мг/мышь) и/или интраперитонеальными (и/п) инъекциями mAb к PD-1 (200 мг/мышь) два раза в неделю. Контрольную группу обрабатывали PBS тем же способом введения и с тем же протоколом как группу комбинированного лечения. На сутки 21 мышей умерщвляли и удаляли легкие. После фиксации в растворе Буэна в течение по меньшей мере 24 ч подсчитывали количество опухолей в легких.

Результаты исследования приведены на фиг. 6. Как и ожидалось, вследствие того, что меланома B16 является низко иммуногенной опухолью, монотерапия mAb к PD-1 не оказывала эффекта на количество опухолей в легких. C215Fab-SEA отдельно снижал количество опухолей B16 в легких приблизительно на 50%, от  $217,1 \pm 15,9$  (среднее значение  $\pm$ SEM) опухолей у мышей, обрабатываемых контролем, до  $98,8 \pm 16,4$  на сутки 21. C215Fab-SEA и mAb к PD-1 в комбинации снижали количество опухолей приблизительно на 80%, значительное снижение ( $p < 0,05$ ) по сравнению с монотерапией.

Эти результаты дополнительно демонстрируют возможность объединения направленного на опухоль суперантигена с иммуностимулятором для лечения низко иммуногенных опухолей.

Включение посредством ссылки.

Полное описание каждого из патентных и научных документов, указанных в настоящем описании, введено посредством ссылки для всех целей.

Эквиваленты.

Изобретение можно воплощать в других конкретных формах, не выходя за рамки сущности или основных его характеристик. Таким образом, указанные выше варианты осуществления следует рассматривать во всех аспектах иллюстративно, а не как ограничивающие изобретение, описываемое в настоящем описании. Таким образом, объем изобретения указан прилагаемой формулой изобретения, а не указанным выше описанием, и все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены входить в него.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий: введение пациенту (i) эффективного количества конъюгата суперантигена, содержащего суперантиген, содержащий аминокислотные остатки 226-458 SEQ ID NO: 7 или ее иммунологически реактивного варианта и/или фрагмента, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с антигеном злокачественной опухоли 5T4, экспрессируемым злокачественными клетками у пациента; и (ii) эффективное количество иммуностимулятора, выбранного из антитела к PD-1 и антитела к PD-L1, таким образом, чтобы усиливать иммунный ответ у пациента против злокачественных клеток для лечения злокачественной опухоли.
2. Способ по п.1, где суперантиген вводят пациенту до, одновременно или после иммуностимулятора.
3. Способ по п.1 или 2, где суперантиген связывается с Т-клеточным рецептором на поверхности Т-клетки.
4. Способ по любому из пп.1-3, где направляющий фрагмент представляет собой антитело к 5T4.
5. Способ по п.4, где антитело к 5T4 содержит фрагмент Fab, который связывается с антигеном злокачественной опухоли 5T4.
6. Способ по любому из пп.1-5, где конъюгат суперантигена содержит первую белковую цепь, содержащую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, содержащую SEQ ID NO: 9.
7. Способ по любому из пп.3-6, где лиганд программируемой гибели клеток (PD-L) экспрессируется на поверхности злокачественных клеток, который связывается с программируемым гибелью клеток белком 1 (PD-1), экспрессируемым Т-клеткой.
8. Способ по п.7, где иммуностимулятор предотвращает связывание PD-L с PD-1, экспрессируемым на поверхности Т-клетки.
9. Способ по п.1, где антитело к PD-1 или антитело к PD-L1 относится или основано на изоците IgG4 человека.
10. Способ по п.1, где иммуностимулятор представляет собой антитело к PD-1.
11. Способ по п.1 или 10, где антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба и пембролизумаба.
12. Способ по п.1, где иммуностимулятор представляет собой антитело к PD-L1.
13. Способ по п.1 или 12, где антитело к PD-L1 выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба и MEDI4736.
14. Способ по любому из пп.1-13, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака желудка, немелкоклеточного рака

легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, печеночно-клеточного рака и рака кожи.

15. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая:

(i) эффективное количество конъюгата суперантигена, содержащего суперантиген, содержащий аминокислотные остатки 226-458 SEQ ID NO: 7 или ее иммунологически реактивного варианта и/или фрагмента, ковалентно связанный с направляющим фрагментом, который связывается с антигеном злокачественной опухоли 5T4, экспрессируемым злокачественными клетками у пациента;

(ii) эффективное количество иммуностимулятора, выбранного из антитела к PD-1 и антитела к PD-L1; и

(iii) фармацевтически приемлемый эксципиент.

16. Композиция по п.15, где суперантиген связывается с T-клеточным рецептором, экспрессируемым на клеточной поверхности T-клетки.

17. Композиция по п.15 или 16, где направляющий фрагмент представляет собой антитело к 5T4.

18. Композиция по п.17, где антитело к 5T4 содержит фрагмент Fab, который связывается с антигеном злокачественной опухоли 5T4.

19. Композиция по любому из пп.15-18, где конъюгат суперантигена содержит первую белковую цепь, содержащую SEQ ID NO: 8, и вторую белковую цепь, содержащую SEQ ID NO: 9.

20. Композиция по любому из пп.16-19, где иммуностимулятор предотвращает связывание PD-L, экспрессируемого злокачественными клетками, с PD-1, экспрессируемым T-клетками.

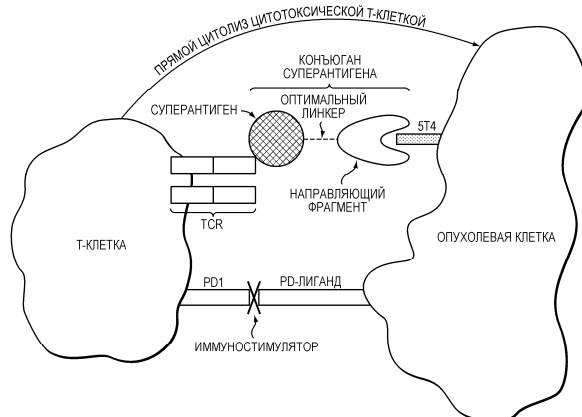
21. Композиция по п.15, где антитело к PD-1 или антитело к PD-L1 относится или основано на изо-типе IgG4 человека.

22. Композиция по п.15, где иммуностимулятор представляет собой антитело к PD-1.

23. Композиция по п.15 или 22, где антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба и пембролизумаба.

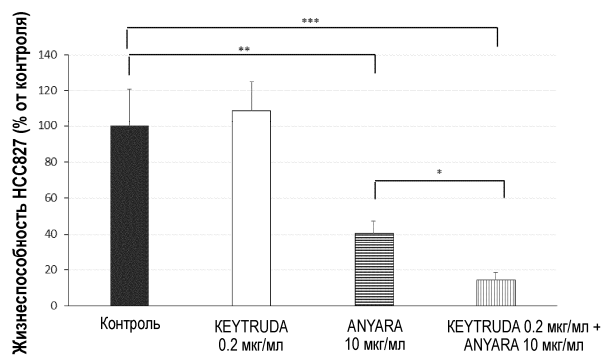
24. Композиция по п.15, где иммуностимулятор представляет собой антитело к PD-L1.

25. Композиция по п.15 или 24, где антитело к PD-L1 выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба и MEDI4736.

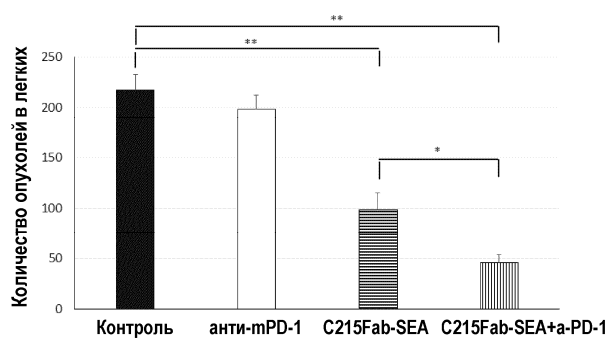


Фиг. 1





Фиг. 5



Фиг. 6

