

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192555** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.25

(22) Дата подачи заявки
2020.03.18

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 19382194.9

(32) 2019.03.19

(33) EP

(86) PCT/EP2020/057492

(87) WO 2020/187998 2020.09.24

(71) Заявитель:

**ФУНДАСИО ПРИВАДА ИНСТИТУТ
Д'ИНВЕСТИГАСИО ОНКОЛОХИКА
ДЕ ВАЛЬ ЭБРОН; ИНСТИТУСИО
КАТАЛАНА ДЕ РЕСЕРКА
И ЭСТУДИС АВАНКАТС;
ПЕПТОМИК, С.Л. (ES)**

(72) Изобретатель:

**Соусек Лаура, Болье Мари-Эв,
Касакуберга-Серра Сильвия (ES)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к комбинации иммуноонкологического средства с Ототус, его функционально эквивалентным вариантом, конъюгатом, включающим Ототус или указанный функционально эквивалентный вариант, полинуклеотидом, кодирующим указанные полипептиды, вектором, содержащим указанный полинуклеотид, и клеткой, способной секретировать полипептид или конъюгат. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим комбинацию по изобретению, и к их медицинскому применению, в частности их применению в лечении рака.

A1

202192555

202192555

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 570497EA/019

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области лечения рака и, более конкретно, к комбинации, включающей полипептиды и иммуноонкологические средства, и ее применению в медицине, более конкретно, в предотвращении и/или лечении рака.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Идеальное противораковое лекарственное средство должно быть направлено на важную функцию, постоянно необходимую для поддержания опухоли, но необязательную для поддержания и функционирования любых нормальных тканей. Следовательно, наиболее распространенным логическим решением является нацеливание на продукты генов, которые специфически мутируют при раке, на основании того, что эти мутантные молекулы вероятно являются «движущими силами» рака и возможно менее критичны для нормальных тканей. По этим причинам большое внимание уделяется каталогизации регулярно возникающих очагов поражения при конкретных видах рака. К сожалению, у данного подхода есть несколько недостатков. Во-первых, большинство солидных раковых опухолей человека проходят через эпизоды геномной нестабильности и характеризуются мутационным шумом, который может скрывать «определяющие» мутации и сопутствующие им эффекторные пути. Во-вторых, раковые заболевания являются конечным результатом процесса, который включает переход через множество эволюционных ограничивающих факторов. Для каждого ограничивающего фактора может быть нужна мутация определенного типа, функция которой впоследствии перестает быть незаменимой для поддержания опухоли и, следовательно, не является хорошей терапевтической мишенью после данного момента в эволюции опухоли.

Мус представляет собой основной белок лейциновой застёжки со структурой спираль-петля-спираль (b-HLN-LZ), вовлеченный в контролирование роста и развитие рака, и функционирующий в сети со структурно родственными белками Max, Mad и Mnt. Димеры Мус/Max активируют транскрипцию генов и индуцируют клеточную пролиферацию или апоптоз. Комплексы Mad/Max и Mnt/Max действуют как репрессоры и вызывают остановку роста клеток и дифференциацию. Все димеры узнают один и тот же консенсусный сайт ДНК, E-боксы CACGTG.

Мус жестко регулируется в нормальных клетках, где его уровень выше в пролиферирующих и ниже в не пролиферирующих клетках. Аберрантно высокая и/или разрегулированная активность Мус имеет причинно-следственную связь с большинством видов рака и часто ассоциирована с агрессивными, плохо дифференцированными и ангиогенными опухолями. Нарушение регуляции экспрессии Мус обусловлено избыточной экспрессией за счет амплификации генов, потерей транскрипционного контроля, нарушением деградации или повышенной стабилизацией. Это приводит к аберрантной пролиферации, повышению выживаемости, изменениям в метаболизме,

ангиогенезу и воспалению, все из которых являются основными отличительными признаками рака. Многочисленные исследования подтвердили решающую роль Мус в регулировании внутриклеточных и внеклеточных аспектов опухолевого генеза, что позволяет предположить терапевтическую ценность воздействия на его функцию.

Известно, что понижающая регуляция Мус ингибитором бромдомена ВЕТ приводит к регрессии опухолей многих видов. При том, что данный подход обладает хорошим потенциалом, он имеет некоторые ограничения, такие как токсичность и многочисленные побочные эффекты. Многие малые молекулы, нарушающие взаимодействие Мус/Мах, показали низкую специфичность в клетках.

Однако ингибитор Мус еще не стал клинически доступным, и его разработка сопряжена с различными трудностями: во-первых, Мус является ядерным фактором транскрипции, который, следовательно, более труднодоступен, чем мембранные или цитоплазматические молекулы; во-вторых, у Мус нет ферментативного «активного сайта», который может стать мишенью; в-третьих, семейство Мус включает 3 различных белка, с-, N- и L-Мус, которые в определенных условиях являются функционально резервными, вследствие этого необходимо их все ингибировать одновременно. Кроме того, были высказаны опасения, что ингибирование Мус может вызывать серьезные побочные эффекты вследствие ингибирования пролиферации нормальных тканей. В силу всех этих причин создание лекарственного средства, ингибирующего Мус, является сложной задачей.

Ототус является доминантно-негативным мутантом МУС, содержащим домен b-NLN-LZ Мус и имеющим четыре аминокислотные замены в лейциновой застежке Мус (Soucek, L. et al., 1998, *Oncogene* 17, 2463-2472; Soucek, L. et al. (2002), *Cancer Res* 62: 3507-3510). Аминокислотные замены E61T, E68I, R74Q и R75N придают измененную специфичность димеризации белку, который сохраняет способность связывать своего естественного партнера Мах и образовывать гомодимеры сам с собой, а также гетеродимеры с с-, N- и L-Мус дикого типа.

Благодаря этим свойствам Ототус способен предотвращать Мус-зависимые функции трансактивации генов как *in vitro*, так и *in vivo*, за счет нейтрализации способности Мус связывать узнаваемый им сайт связывания ДНК, E-бокс. В то же время Ототус сильно потенцирует Мус-индуцируемый апоптоз зависимым от уровня экспрессии Мус образом, и тем самым усиливает трансрепрессивную активность Мус. Таким образом, Ототус предотвращает связывание Мус с E-боксами промоторов и трансактивацию генов-мишеней, при этом сохраняя Miz-1-зависимое связывание с промоторами и трансрепрессию. В присутствии Ототус интерактом Мус направляется на репрессию и его активность переключается с проонкогенной на опухоль-подавляющую.

В EP2801370 A1 было показано, что сам пептид Ототус способен эффективно проникать через клеточную мембрану и транслоцироваться в ядро, где он оказывает свое опухоль-подавляющее действие.

Однако в данной области сохраняется потребность в разработке новых

усовершенствованных терапевтических подходов к лечению рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретение относится к комбинации, включающей:

i) первый компонент, выбранный из группы, состоящей из:

a) полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта,

b) конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта,

c) полинуклеотида, кодирующего полипептид по п. a) или конъюгат по п. b),

d) вектора, содержащего полинуклеотид по п. c), и

e) клетки, способной секретировать в среду полипептид по п. a) или конъюгат по п.

b).

и

ii) второй компонент, который представляет собой иммуноонкологическое средство.

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически эффективное количество комбинации по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В третьем аспекте изобретение относится к комбинации по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в медицине.

В четвертом аспекте изобретение относится к комбинации по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в предотвращении и/или лечении рака.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. *Интраназальное введение Омотус приводит к рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли.* Мышам с KRas^{G12D}-индуцируемым НМРЛ вводили интраназально Омотус 4 раза в неделю в течение 4 недель. (А) Введение Омотус индуцировало рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли уже через 1 неделю после начала введения, и Т-клетки оставались там на протяжении всего лечения. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (В) FACS-анализ показывает, что Омотус индуцирует рекрутинг CD4 Т-клеток к опухоли, в частности, активированных CD4 Т-клеток, демонстрирующих повышенные уровни PD-1, а также молекул PD-1 и Tim-3. Омотус также индуцирует размножение регуляторных Т-клеток (Treg).

Фигура 2. *Системное введение Омотус приводит к рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли.* Клетки линии MuH-163 НМРЛ с мутацией Kras/p53 инокулировали подкожно сингенным мышам. Мышам вводили Омотус системно в течение 3 недель. Омотус вызывал рекрутинг большего количества CD3⁺ Т-клеток к зоне опухоли (А), и значительно большего количества CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих молекулы как PD-1, так и Tim-3, в сравнении с контролями с растворителем (В). ** $p < 0,01$.

Фигура 3. *Ототус в комбинации с анти-PD-1 приводит к рекрутингу CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ Т-клеток к опухоли.* Мышам с KRas^{G12D}-индуцируемым НМРЛ вводили интраназально Ототус 4 раза в неделю, и один раз в неделю анти-PD-1 (250 мкг) внутривентриально в течение 4 недель. Ототус в комбинации с анти-PD-1 индуцировал рекрутинг CD4⁺ PD-1⁺Tim-3⁻ Т-клеток к зоне опухоли.

Фигура 4. *Ототус в комбинации с анти-PD-1 вызывает продуцирование IFN-γ.* Комбинированное введение Ототус и анти-PD-1 вызывало продуцирование IFN-γ внутриопухолевыми CD4 (А) и CD8 (В) Т-клетками.

Фигура 5. *Комбинация Ототус с анти-PD-1 антителом синергически увеличивает относительную долю здоровых легких и приводит к рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли.* Мышам с KRas^{G12D}-индуцируемым НМРЛ вводили интраназально Ототус 4 раза в неделю в течение 4 недель, и анти-PD-1 антитело один раз в неделю внутривентриально. (А) У животных, получавших Ототус в комбинации с анти-PD-1, наблюдалась повышенная относительная доля здоровых легких в сравнении с группами введения растворителя и только лекарственного средства. (В) Репрезентативные КТ-изображения в поперечной плоскости для животных из каждой экспериментальной группы, полученные в начале и в конце лечения. Темные области соответствуют здоровым легким, и серые области соответствуют пораженным легким. (С) FACS-анализ показал, что Ототус и анти-PD-1, введенные в комбинации, индуцировали рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности, CD4 Т-клеток и Th1/Th17 клеток. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,0001.

Фигура 6. *Комбинация Ототус с анти-CTLA-4 антителом синергически приводит к уменьшению роста опухоли и рекрутингу противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли.* Мышам с KRas^{G12D}-индуцируемым НМРЛ вводили интраназально Ототус 4 раза в неделю в течение 4 недель, и анти-PD-1 антитело один раз в неделю внутривентриально. (А) У животных, получавших Ототус в комбинации с анти-PD-1, наблюдался меньший рост опухоли в сравнении с группами введения растворителя и только лекарственного средства. В таблице приведены средние показатели роста опухоли для каждой из групп лечения. (В) FACS-анализ показал, что Ототус и анти-PD-1, введенные в комбинации, индуцировали рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности, CD4 Т-клеток, а также CD4 и CD8 PD-1⁺ Т-клеток. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,0001.

Фигура 7. *Введенные последовательно в комбинации Ототус и анти-PD-1 антитело синергически приводят к рекрутингу противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли.* Мышам с KRas^{G12D}-индуцируемым НМРЛ вводили в течение 10 дней внутривенно Ототус каждые 4 дня, а затем анти-PD-1 антитело один раз в неделю внутривентриально. FACS-анализ показал, что последовательное введение Ототус, а затем анти-PD-1 индуцировало рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности, CD4 Т-клеток, экспрессирующих молекулы как PD-1, так и Tim-3, а также Th1/Th17 Т-клеток, экспрессирующих PD-1. *p<0,05; **p<0,01.

Фигура 8. *Комбинация Ототус с анти-PD-1 антителом синергически приводит к*

рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли. Мышам с KRas^{G12D}/p53-индуцируемым НМРЛ вводили Отомус (внутривенно) и анти-PD-1 (внутрибрюшинно) одновременно один раз в неделю. (А) ИГХ окрашивание показало, что одновременное введение Отомус и анти-PD-1 приводило к значительному рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли. (В) FACS-анализ показал, что введение Отомус с анти-PD-1 приводило к общему рекрутингу иммуноцитов к зоне опухоли. *p<0,05; **p<0,01.

Фигура 9. *Высокий уровень экспрессии CD3, CD4, IL-17 и IFN-γ коррелирует с более высокими показателями выживаемости.* Репрезентативные кривые Каплана-Мейера для пациентов с НМРЛ, с учетом экспрессии CD3, CD4, IL-17 и IFN-γ. В таблицах под графиками показана выживаемость для верхнего квартиля. Графики строили с использованием программы построения графиков Каплана-Мейера <http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к предложению новых терапевтических комбинаций для предотвращения и лечения рака.

Если не указано иначе, все технические термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение.

Все варианты осуществления, раскрытые в отношении одного из аспектов изобретения, применимы и к другим аспектам.

Комбинации и фармацевтические композиции по изобретению

Определения, приведенные в данном, и в каждом другом, аспекте изобретения, в равной степени применимы ко всему изобретению.

Авторы настоящего изобретения показали, что интраназальное и системное введение Отомус вызывает рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли (Фигуры 1 и 2). Таким образом, Отомус может быть полезен для лечения рака в комбинации с иммуноонкологическими средствами. Кроме того, было установлено, что комбинация Отомус и иммуноонкологического средства обладает синергическим эффектом в лечении рака. Например, комбинированная терапия Отомус и анти-PD-1 значительно увеличивает рекрутинг CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, но не Tim-3, к зоне опухоли в сравнении с группами введения как растворителя, так и только анти-PD-1 (Фигура 3). Кроме того, комбинированная терапия Отомус и анти-PD-1 в значительной степени вызывает продуцирование интерферона-γ (IFN-γ) как CD4⁺ хелперами, так и CD8⁺ цитотоксическими внутриопухолевыми Т-клетками (Фигура 4), в сравнении с введением растворителя, факт, который не был замечен ни в группе введения Отомус, ни в группе введения анти-PD-1. Рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли приводит к синергическому увеличению относительной доли здоровых легких при лечении субъектов, страдающих от рака легких (Фигура 5). Этот синергический эффект сохраняется независимо от пути введения, дозы и режима введения (Фигуры 7 и 8). Также было обнаружено, что комбинированная терапия Отомус и анти-CTLA-4 синергически приводит к уменьшению

роста опухоли и рекрутингу противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли (Фигура б).

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к комбинации, включающей:

i) первый компонент, выбранный из группы, состоящей из:

a) полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта,

b) конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта,

c) полинуклеотида, кодирующего полипептид по п. a) или конъюгат по п. b),

d) вектора, содержащего полинуклеотид по п. c), и

e) клетки, способной секретировать в среду полипептид по п. a) или конъюгат по п.

b)

и

ii) второй компонент, который представляет собой иммуноонкологическое средство.

Используемое в настоящем документе выражение «комбинация» означает различные комбинации соединений (i) и (ii), например, в композиции, сформулированной в виде одного препарата, в комбинированной смеси, такой как «баковая смесь», состоящей из отдельных препаратов каждого из компонентов, которые могут быть объединены для совместного использования в качестве комбинированного препарата, и при комбинированном использовании отдельных активных ингредиентов в последовательном порядке, то есть, одного за другим с достаточно коротким интервалом, например несколько часов или дней, или при одновременном введении. В настоящем изобретении термин «соединение (i)» относится к терапевтически эффективному количеству полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта, или относится к конъюгату, включающему полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта, или относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид или конъюгат, или относится к вектору, содержащему полинуклеотид, или относится к клетке, способной секретировать в среду полипептид или конъюгат. В настоящем изобретении термин «соединение (ii)» относится к терапевтически эффективному количеству иммуноонкологического средства. Предпочтительно, порядок применения соединений (i) и (ii) неважен для осуществления на практике настоящего изобретения.

Комбинация может представлять собой набор компонентов, в котором каждый из компонентов индивидуально сформулирован и упакован.

Комбинация соединений (i) и (ii) может быть сформулирована для

одновременного, раздельного или последовательного введения. В частности, если введение не является одновременным, соединения вводят в непосредственной близости по времени друг от друга. Кроме того, соединения вводят в одинаковых или разных лекарственных формах, либо одинаковыми или разными путями введения, например, одно соединение может быть введено перорально, и другое соединение может быть введено внутривенно. Предпочтительно, соединение (i) вводят интраназально, и соединение (ii) вводят системно, более предпочтительно парентерально, даже более предпочтительно внутривенно. В другом варианте осуществления соединения (i) вводят внутривенно, и соединения (ii) вводят парентерально, даже более предпочтительно внутривенно.

Комбинацию двух соединений (i) и (ii) можно вводить:

- в виде комбинации, которая является частью одной и той же лекарственной формы, тогда два соединения всегда вводят одновременно.

- в виде комбинации двух единиц, каждая с одним из веществ, с возможностью одновременного, последовательного или раздельного введения.

В конкретном варианте осуществления соединения (i) комбинации по изобретению вводят независимо от соединения (ii), то есть в двух единицах, но в одно и то же время.

В другом конкретном варианте осуществления соединения (i) комбинации по изобретению вводят первым, а затем соединения (ii), то есть соединения (ii) вводят отдельно или последовательно.

В другом конкретном варианте осуществления соединения (ii) комбинации по изобретению вводят первым, а затем соединения (i), то есть соединения (i) вводят отдельно или последовательно, как определено. В случае раздельного введения соединения (i) и (ii) комбинации по изобретению можно вводить с интервалом времени между ними, составляющим, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа. В другом варианте осуществления соединения (i) и (ii) комбинации по изобретению можно вводить с интервалом времени, составляющим 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 дня, предпочтительно с интервалом 1 день между ними, более предпочтительно с интервалом 10 дней между ними. В предпочтительном варианте осуществления соединения (ii) вводят через 10 дней после первого введения соединения (i). В одном из вариантов осуществления введение первого соединения прекращают перед началом введения второго соединения.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации или фармацевтической композиции, содержащей синергически эффективное количество первого компонента по первому аспекту изобретения и иммуноонкологического средства.

В предпочтительном варианте осуществления соединения (i) по изобретению представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант.

В настоящем документе термины «полипептид» и «пептид» использованы взаимозаменяемо для обозначения полимеров любой длины из аминокислот. Полипептид

по изобретению может содержать модифицированные аминокислоты, среди которых могут находиться не являющиеся аминокислотами компоненты. В предпочтительном варианте осуществления полипептид состоит исключительно из аминокислот. Предпочтительно, полипептид, составляющий компонент (i) комбинации, имеет длину от 80 до 500 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 300 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 250 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 150, даже более предпочтительно от 80 до 130 аминокислот, предпочтительно от 90 до 130 аминокислот, предпочтительно не более 125 аминокислот, более предпочтительно не более 100 аминокислот. В предпочтительном варианте осуществления полипептид имеет длину от 90 до 98 аминокислот, предпочтительно от 90 до 95 аминокислот, более предпочтительно 91 аминокислоту.

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют как природные аминокислоты. Кроме того, термин «аминокислота» охватывает как D-, так и L-аминокислоты (стереоизомеры), предпочтительно L-аминокислоты.

Термин «природные аминокислоты», или «существующие в природе аминокислоты», охватывает 20 существующих в природе аминокислот; те аминокислоты, которые часто посттрансляционно модифицированы *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; а также другие необычные аминокислоты, включая, но без ограничения, 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин.

Используемый в настоящем документе термин «неприродная аминокислота», или «синтетическая аминокислота», означает карбоновую кислоту, или ее производное, замещенную в положении «а» аминогруппой и структурно родственную природной аминокислоте. Иллюстративные неограничивающие примеры модифицированных или необычных аминокислот включают 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроевую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, 6-N-метиллизин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, орнитин и так далее.

Полипептид по настоящему изобретению также может содержать не аминокислотные фрагменты, такие как, например, гидрофобные фрагменты (различные линейные, разветвленные, циклические, полициклические или гетероциклические углеводороды и производные углеводородов), связанные с пептидами; различные защитные группы, которые присоединены к концам соединения для уменьшения деградации. Соответствующие защитные функциональные группы описаны в сборнике Green and Wuts, «Protecting Groups in Organic Synthesis», John Wiley and Sons, главы 5 и 7,

1991 г.

Химические (не аминокислотные) группы, присутствующие в полипептиде, могут быть включены с целью улучшения различных физиологических свойств; уменьшения деградации или клиренса; уменьшения отталкивания различными клеточными насосами, упрощения разных способов введения, повышения специфичности, повышения аффинности, повышения стабильности, биодоступности, растворимости, уменьшения токсичности и тому подобного.

«Миметик» включает молекулы, которые имитируют химическую структуру пептидной структуры и сохраняют функциональные свойства пептидной структуры. Подходы к разработке пептидных аналогов, производных и миметиков известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления полипептид по изобретению представляет собой полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1, или полипептид, состоящий из функционально эквивалентного варианта SEQ ID NO: 1, предпочтительно представляет собой полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 соответствует

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYIL
SVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 1)

Полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 соответствует белковой последовательности Омомус. Используемый в настоящем документе термин «Омомус» означает полипептид, который состоит из мутантного варианта домена bHLHZip белка Мус с мутациями E61T, E68I, R74Q и R75N (где нумерация положений мутаций приведена относительно последовательности области Мус, соответствующей аминокислотам 365-454 полипептида, имеющего регистрационный номер NP_002458 в базе данных NCBI выпуска 15 марта 2015 г.). Последовательность с-Мус, имеющая в базе данных NCBI регистрационный номер NP_002458, приведена ниже (SEQ ID NO: 2), где область, из которой происходит Омомус, подчеркнута:

1 M~~DFFRVV~~ENQ QPPATMPLNV SFTNRNYDL~~D~~ YDSVQPYFYC DEEENFYQQQ
QQSELQPPAP

61 SEDIWKKFEL LPTPPLSPSR RSGLCSPSYV AVTPFSLRGD NDGGGGSFST
ADQLEMVTEL

121 LGGDMVNQSF ICDPDETFI KNIIIQDCMW SGFSAAAKLV SEKLASYQAA
RKDSGSPNPA

181 RGHSVCSSTSS LYLQDLSAAA SECIDPSVVF PYPLNDSSSP KSCASQDSSA
FSPSSDSL~~LS~~

241 STESSPQGSP EPLVLHEETP PTTSSDSEEE QEDEEEIDVV SVEKRQAPGK
RSESGSPSAG

301 GHSKPPHSPL VLKRVHSTH QHNYAAPPST RKDYPAAKRV
KLDSVRVLRQ ISNNRKCTSP

361 RSSDTEENVK RRTHNVLERQ RRNELKRSEF ALRDQIPELE NNEKAPKVVI

LKKATAYILS

421 VQAEEQKLIS EEDLLRKRRE QLKHKLEQLR NSCA (SEQ ID NO: 2)

Ототус также содержит домен M2 из с-Мус, имеющий последовательность RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 3) (смотри Dang and Lee, Mol. Cell. Biol., 1988, 8:4048-4054) (подчеркнуто двойной чертой выше), и соответствующий сигналу ядерной локализации.

Ототус характеризуется тем, что он проявляет повышенную способность к димеризации со всеми тремя онкогенными белками Мус (с-Мус, N-Мус и L-Мус). Ототус может происходить из домена bHLHZip любого белка Мус, известного в данной области, при условии наличия мутаций, приводящих к эффекту супрессии опухолей. Таким образом, Ототус, который может быть использован по настоящему изобретению, может происходить из белка любого вида млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, домашних и сельскохозяйственных животных (коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек или грызунов), приматов и людей. Предпочтительно, белок Ототус происходит из белка Мус человека (регистрационный номер NP_002458, выпуск 12 марта 2019 г.).

Используемый в настоящем документе термин «Мус» относится к семейству факторов транскрипции, которое включает с-Мус, N-Мус и L-Мус. Белок Мус активирует экспрессию многих генов путем связывания с консенсусной последовательностью CACGTG (последовательности Enhancer-боксы или E-боксы и рекрутинга гистон-ацетилтрансфераз, или НАТ). Однако Мус также может действовать в качестве репрессора транскрипции. Путем связывания фактора транскрипции Miz-1 и вытеснения коактиватора р300 он ингибирует экспрессию генов-мишеней Miz-1. Мус также играет непосредственную роль в контроле репликации ДНК.

Мус b-HLH-LZ, или основная область Мус - домен лейциновой застёжки со структурой спираль-петля-спираль, представляет собой область, которая определяет димеризацию Мус с белком Max и связывание с генами-мишенями Мус. Эта область соответствует аминокислотам 365-454 белка Мус человека и характеризуется наличием двух альфа-спиралей, связанных петель (Nair, S. K., & Burley, S. K., 2003, Cell, 112: 193-205).

В предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению представляет собой полипептид, который содержит, состоит из, или состоит в основном из SEQ ID NO: 4, приведенной ниже.

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYI
LSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 4)

В данном контексте «состоит в основном из» означает, что указанная молекула не содержит какие-либо дополнительные последовательности, которые изменяли бы активность SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно, полипептид состоит из SEQ ID NO: 4.

Термин «функционально эквивалентный вариант» относится к любому полипептиду, полученному в результате вставки или добавления одной или более

аминокислот и/или в результате делеции одной или более аминокислот, и/или в результате консервативной замены одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1; и/или полученному в результате химической модификации полипептида с SEQ ID NO: 1, который по существу сохраняет способность к супрессии опухоли, присущую SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, термин «функционально эквивалентный вариант» относится к любому полипептиду, полученному в результате вставки или добавления одной или более аминокислот и/или в результате делеции одной или более аминокислот, и/или в результате консервативной замены одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1, который по существу сохраняет способность к супрессии опухоли, присущую SEQ ID NO: 1; более предпочтительно, полученному в результате вставки или добавления одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1.

Квалифицированный специалист понимает, что для сохранения способности к супрессии опухоли необходимо, чтобы вариант мог димеризоваться с Мус и/или его обязательным партнером p21/p22Max и ингибировать активность Мус, чтобы он мог перемещаться через клеточную мембрану и чтобы он мог перемещаться через ядерную оболочку. В некоторых вариантах осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида по изобретению гомодимеризуется в меньшей степени, чем Отомус, или не вынужден образовывать гомодимеры за счет образования дисульфидной связи. В частности, образование дисульфидной связи в гомодимерной форме конкретных вариантов осуществления полипептида по изобретению происходит в меньшей степени, чем в полипептиде ОтоМус.

Используемое в настоящем документе выражение «гомодимеризация в меньшей степени» означает меньшую способность к образованию обязательных гомодимеров полипептида по изобретению, даже в восстанавливающих условиях. В предпочтительном варианте осуществления способность уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% в сравнении со способностью Отомус к образованию гомодимеров.

Используемый в настоящем документе термин «восстанавливающие условия» означают присутствие восстанавливающего агента, соединения, которое отдает электрон другому химическому соединению в окислительно-восстановительной химической реакции. Иллюстративными неограничивающими примерами восстанавливающих агентов являются ДТТ (дитиотреитол), β -меркаптоэтанол или ТСЕР (трис(2-карбоксиитил)фосфин). Возможно, что количество гомодимеров *in vitro* является одинаковым, и что различие между функционально эквивалентным вариантом и Отомус имеет место только в клетках в присутствии партнеров по гетеродимеризации, когда

отсутствие дисульфидной связи потенциально допускает в большей степени образование гетеродимеров.

Можно использовать несколько анализов для определения гомодимеризации пептида, в качестве иллюстративного неограничивающего примера можно назвать анализ тепловой денатурации, контролируемой с помощью кругового дихроизма, так что димеризацию можно обнаруживать за счет сворачивания и количественной оценки термостабильности.

Подходящие функционально эквивалентные варианты включают полипептиды, состоящие в основном из полипептида с SEQ ID NO: 1. В данном контексте «состоящие в основном из» означает, что указанная молекула не содержит какие-либо дополнительные последовательности, которые изменяли бы активность SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид, который получен в результате вставки или добавления одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентный вариант получен в результате вставки менее 10 аминокислот, более предпочтительно менее 5 аминокислот, более предпочтительно, получен в результате вставки одной аминокислоты. В предпочтительном варианте осуществления вариант получен в результате вставки одной аминокислоты, которая представляет собой метионин.

В другом варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид, который получен в результате делеции одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентный вариант получен в результате делеции менее 10 аминокислот, более предпочтительно менее 5 аминокислот, более предпочтительно получен в результате делеции одной аминокислоты.

Подходящими функциональными вариантами нацеленного пептида являются такие, которые имеют степень идентичности с пептидом с SEQ ID NO: 1, превышающую 25% идентичности аминокислотной последовательности, например, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Степень идентичности между двумя полипептидами определяют с использованием компьютерных алгоритмов и способов, хорошо известных специалистам в данной области. Идентичность двух аминокислотных последовательностей предпочтительно определяют с использованием алгоритма BLASTP, описанного ранее (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 1990;215: 403-410). В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательностей определяют по всей длине полипептида с SEQ ID NO: 1 или по всей длине варианта, или и того, и другого.

Функционально эквивалентные варианты полипептида по изобретению также могут включать посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, миристоилирование, протеолитический процессинг

и так далее.

В другом варианте осуществления подходящими функциональными вариантами нацеленного пептида являются такие, в которых одно или более положений в полипептиде по изобретению содержат аминокислоту, которая является консервативной заменой аминокислоты, присутствующей в белке, упомянутом выше. «Консервативные аминокислотные замены» представляют собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства. Например, каждая из следующих шести групп включает аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), серин (S), треонин (T); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). Выбор таких консервативных аминокислотных замен находится в пределах компетенции специалиста в данной области, и описан, например, в публикациях Dordo et al. (*J. Mol. Biol.*, 1999, 217:721-739) и Taylor et al. (*J. Theor. Biol.*, 1986, 119:205-218).

Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Омотус имеют мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Омотус, полученном из с-Мус человека. Положение, в котором указанные мутации должны находиться в функционально эквивалентном варианте, могут быть определены путем множественного выравнивания последовательностей для разных последовательностей Мус и идентифицированы путем выравнивания этих положений, соответствующих положениям 61, 68, 74 и 75 в последовательности Омотус, полученного из с-Мус человека. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентные варианты Омотус имеют мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Омотус, полученном из с-Мус человека.

В другом варианте осуществления функционально эквивалентные варианты Омотус имеют мутации в положениях, соответствующих E61, E68, R74 и R75 в последовательности Омотус, где E61 мутировал в E61A или E61S; E68 мутировал в E68L, E68M или E68V; R74 мутировал в R74N и R75 мутировал в R75Q.

Множественное выравнивание последовательностей представляет собой расширенный вариант попарного выравнивания, включающий анализ более двух последовательностей одновременно. В способах множественного выравнивания выравнивают все последовательности в конкретном наборе запросов. Предпочтительной программой для множественного выравнивания последовательностей (и ее алгоритмом) является ClustalW, Clusal2W или ClustalW XXL (смотри Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680). После того, как последовательности с-Мус из разных организмов и варианта сравнены (выровнены), как описано в настоящем документе, квалифицированный специалист может с легкостью определять положения в каждой последовательности, соответствующие положениям E61T, E68I, R74Q и R75N,

имеющимся в Oтотус, и вносить в вариант Oтотус мутации, соответствующие мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Oтотус, полученном из с-Мус человека.

Соответствующие анализы для определения того, можно ли полипептид считать функционально эквивалентным вариантом Oтотус, включают, без ограничения:

- Анализы, в которых измеряют способность полипептида к образованию димерных комплексов с Мах и Мус, такие как анализы, основанные на экспрессии гена репортера, как описано в Soucek et al. (Oncogene, 1998, 17: 2463-2472), а также PLA (анализ лигирования белка) или совместной иммунопреципитации.

- Анализы, в которых измеряют способность полипептида к связыванию с сайтом узнавания Мус/Мах в ДНК (сайт CACGTG), такие как анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA), описанный в Soucek et al. (выше).

- Анализы, в которых измеряют способность к подавлению Мус-индуцированной трансактивации, такие как анализ, основанный на экспрессии гена репортера под контролем связывающих сайтов ДНК, специфических для Мус/Мах, как описано в Soucek et al. (выше).

- Анализы, основанные на способности полипептида к ингибированию роста клеток, экспрессирующих онкоген мус, как описано в Soucek et al. (выше).

- Анализы, в которых измеряют способность к усилению мус-индуцированного апоптоза, такие как анализы, описанные в Soucek et al. (Oncogene, 1998: 17, 2463-2472). Кроме того, можно использовать любой анализ, широко известный в данной области для оценки апоптоза, такой как окрашивание Хехст, йодидом пропидия (PI) или окрашивание аннексином V, метод с трипановым синим, метод ступенчатых полос/фрагментации ДНК и TUNEL.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом Oтотус, если он проявляет активность в одном или более из вышеуказанных анализов, которая составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от активности природного Oтотус.

В конкретном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида с SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином. Предпочтительно, остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет собой алифатическую аминокислоту или серосодержащую аминокислоту, или дикарбоновую аминокислоту, или их амиды, или аминокислоту, имеющую две основные группы, или ароматическую аминокислоту, или циклическую аминокислоту, или гидроксированную аминокислоту. Более предпочтительно, он представляет собой аминокислоту, выбранную из серина, треонина и аланина, предпочтительно, выбранную из серина и аланина.

Подходящие функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, имеющие остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1, который не является цистеином, приведены в следующей таблице.

SEQ ID NO	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
SEQ ID NO: 5	TEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (где X представляет собой любую ак, отличную от Cys)
SEQ ID NO: 6	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVIL LKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (где X представляет собой любую ак, отличную от Cys)
SEQ ID NO: 7	TEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA
SEQ ID NO: 8	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVIL LKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA
SEQ ID NO: 9	TEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA
SEQ ID NO: 10	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVIL LKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида с SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

Кроме того, функционально эквивалентные варианты Омомус также способны трансдуцировать клетки после контакта варианта с указанной клеткой. Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Омомус содержат трансдуцирующий домен белка, имеющийся у природного Омомус, или другой функциональный трансдуцирующий домен белка.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, если он способен трансдуцировать клетку-мишень по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% так же эффективно, как SEQ ID NO: 1.

Кроме того, функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1 также способны перемещаться в ядро опухолевой клетки-мишени.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, если он способен перемещаться в ядро опухолевых клеток-мишеней по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% так же эффективно, как SEQ ID NO: 1.

Подходящие анализы для определения того, является ли полипептид функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1 в отношении его способности перемещаться через клеточную мембрану и в ядро, включают двойное мечение клетки реагентом, специфическим для полипептида, и красителем, который специфически метит

ядро клетки (таким как DAPI или краситель Хехст). Обнаружение полипептида по изобретению можно осуществлять методами конфокальной микроскопии или методом флуоресцентной микроскопии.

В другом предпочтительном варианте осуществления соединение (i) по изобретению представляет собой конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта.

Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» означает два или более соединений, которые ковалентно связаны вместе таким образом, что функция каждого соединения в конъюгате сохраняется.

Термин «химический фрагмент» означает любое химическое соединение, содержащее по меньшей мере один атом углерода. Примеры химических фрагментов включают, но без ограничения, любую пептидную цепь, обогащенную гидрофобными аминокислотами и гидрофобными химическими фрагментами.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгат по изобретению содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, или более, химических фрагментов, которые облегчают поглощение клеткой полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

В одном варианте осуществления химический фрагмент, который облегчает поглощение клеткой полипептида, представляет собой липид или жирную кислоту.

Жирная кислота, как правило, представляет собой молекулу, содержащую углеродную цепь с кислотным фрагментом (например, карбоновой кислотой) на конце цепи. Углеродная цепь жирной кислоты может иметь любую длину, однако предпочтительно, если длина углеродной цепи составляет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более атомов углерода, и любой образуемый из них диапазон. В конкретных вариантах осуществления длина углеродной цепи составляет от 4 до 18 атомов углерода в части цепи жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления углеродная цепь жирной кислоты может содержать нечетное число атомов углерода, однако в конкретных вариантах осуществления может быть предпочтительным четное число атомов углерода в цепи. Жирную кислоту, содержащую в углеродной цепи только одинарные связи, называют насыщенной, жирную кислоту, содержащую в цепи хотя бы одну двойную связь, называют ненасыщенной. Жирная кислота может быть разветвленной, хотя в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения она является неразветвленной. Конкретные жирные кислоты включают, но без ограничения, линолевую кислоту, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, линоленовую кислоту, стеариновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, арахионовую кислоту, пальмитолеиновую кислоту,

арахидоновую кислоту.

В предпочтительном варианте осуществления химический фрагмент, который облегчает поглощение клеткой полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта, представляет собой последовательность проникающего в клетку пептида, в этом случае конъюгат будет представлять собой слитый белок, включающий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и последовательность проникающего в клетку пептида.

Термин «слитый белок» относится к белкам, созданным с помощью генной технологии, которые состоят из двух или более функциональных доменов, полученных из разных белков. Слитый белок может быть получен общепринятыми способами, например, путем экспрессии гена с нуклеотидной последовательностью, кодирующей указанный слитый белок, в соответствующей клетке. Следует понимать, что «проникающий в клетку пептид» означает проникающий в клетку пептид, который отличается от проникающего в клетку пептида, образующего часть полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1.

Термин «последовательность проникающего в клетку пептида» используют в настоящей спецификации взаимозаменяемо с терминами «СРР», «трансдуцирующий домен белка» или «РТД». Он означает пептидную цепь разной длины, которая направляет транспорт белка внутрь клетки. Процесс доставки в клетку обычно происходит путем эндоцитоза, но пептид также может быть интернализирован в клетку путем прямой транслокации через мембрану. СРР, как правило, имеют аминокислотный состав, в котором либо присутствует относительно большое количество положительно заряженных аминокислот, таких как лизин или аргинин, или присутствуют последовательности, которые содержат чередование полярных/заряженных аминокислот и неполярных гидрофобных аминокислот.

Примеры СРР, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают, без ограничения, СРР в белке *Drosophila antennapedia* (RQIKWFAQNRRMKWKK, SEQ ID NO: 13), СРР в ДНК-связывающем белке VP22 вируса простого герпеса 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE, SEQ ID NO: 14), СРР Vac-7 (RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 15), СРР в белке TAT HIV-1, состоящие из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 16), аминокислот 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ, SEQ ID NO: 17), аминокислот 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 18); СРР пептида S413-PV (ALWKTLLKVKLAKPKKKRKV; SEQ ID NO: 19), СРР пенетратина (RQIKWFAQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 20), СРР SynB1 (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 21), СРР SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO: 22), СРР РТД-4 (PIRRRKCLRRLK; SEQ ID NO: 23), СРР РТД-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 24), СРР FHV Coat-(35-49) (RRRRNRTRRNRRRVR; SEQ ID NO: 25), СРР BMV Gag-(7-25) (KMTRAQRRAAARRNRWTAR; SEQ ID NO: 26), СРР HTLV-II Rex-(4-16) (TRRQRTRRRARRNR; SEQ ID NO: 27), СРР D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 28),

CPP R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 29), CPP MAP (KLALKLALKLALALKLA; SEQ ID NO: 30), CPP SBP (MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 31), CPP FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 32), CPP MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 33), CPP MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-суа; SEQ ID NO: 34), CPP Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 35), CPP Pep-2 (ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 36), полиаргининовую последовательность, имеющую структуру RN (где N составляет от 4 до 17), последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37), последовательность RRRRRRLR (SEQ ID NO: 38), последовательность RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 39); транспортан GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 40); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO: 41); RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 42), последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 43); последовательность RKKRRQRR (SEQ ID NO: 44); последовательность YARAAARQARA (SEQ ID NO: 45); последовательность THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 46); последовательность GGRRARRRRR (SEQ ID NO: 47).

В предпочтительном варианте осуществления указанный проникающий в клетку пептид не является эндогенным, содержащимся в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления CPP представляет собой CPP белка TAT HIV-1, состоящий из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 16). В другом предпочтительном варианте осуществления CPP представляет собой последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37) или RRRRRRLR (SEQ ID NO: 38). В другом варианте осуществления CPP представляет собой последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37) или RRRRRRRR (SEQ ID NO: 65).

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой CPP, описанный в WO2019/018898, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления последовательность проникающего в клетку пептида слита на N-конце полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида. В другом варианте осуществления проникающий в клетку пептид слит на C-конце полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки комбинации по изобретению включают, в дополнение к собственному проникающему в клетку пептиду, присутствующему в полипептиде с SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентном варианте указанного полипептида, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, или более, дополнительных проникающих в клетку пептидов.

Соответствующие слитые белки по изобретению включают полипептиды

Омомус*ТАТ и Омомус*LZArg, приведенные ниже:

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
Омомус*ТАТ	11	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNE KAPKVVILKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKH KLEQLRNSCAGRKKRRQRRR
Омомус*LZArg	12	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNE KAPKVVILKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKH KLEQLRNSCARRRRRLR

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления слитый белок представляет собой полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 11 и 12.

Подходящие анализы для определения того, сохраняет ли конъюгат способность к перемещению через клеточную мембрану, свойственную Омомус, включают, без ограничения, анализы, в которых определяют способность конъюгата трансдуцировать клетки в культуре. Этот анализ включает создание контакта конъюгата с культурой клеток и обнаружение присутствия конъюгата во внутриклеточном пространстве.

В другом предпочтительном варианте осуществления конъюгат комбинации по изобретению также содержит дополнительный сигнал ядерной локализации.

Используемый в настоящем документе термин «сигнал ядерной локализации», (NLS), означает аминокислотную последовательность длиной примерно 4-20 аминокислотных остатков, которая служит для направления белка в ядро. Как правило, последовательность ядерной локализации богата основными аминокислотами, и иллюстративные последовательности хорошо известны в данной области (Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7). В некоторых вариантах осуществления NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 (PKKKRKV, SEQ ID NO: 48); NLS нуклеоплазмينا (KRPAATKKAGQAKKKK, SEQ ID NO: 49); NLS CBP80 (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SEQ ID NO: 50); NLS белка Rev HIV-I (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 51); HTLV-I Rex (MPKTRRRPRRSQRKRPT, SEQ ID NO: 52); NLS hnRNP A (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 53); NLS rpL23a (VHSHKKKKIRTSPFTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SEQ ID NO: 54). В одном варианте осуществления изобретения сигнал ядерной локализации содержит мотив K (K/R) X (K/R) (SEQ ID NO: 55).

В еще более предпочтительном варианте осуществления сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из PKKKRKV (SEQ ID NO: 48), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 56) и KRPAATKKAGQ AKKKK (SEQ ID NO: 49).

В другом предпочтительном варианте осуществления NLS может быть N-концевым или C-концевым для конъюгата или слитого белка, содержащего полипептид с SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант.

Квалифицированный специалист понимает, что может быть желательно, чтобы конъюгат по изобретению дополнительно содержал один или более гибких пептидов,

которые соединяют полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, последовательность проникающего в клетку пептида и/или NLS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида. В другом конкретном варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через гибкий пептид. В одном из вариантов осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант, непосредственно связан с NLS. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, связан с NLS через гибкий пептид.

В конкретном варианте осуществления полипептид конъюгата по изобретению непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида и с NLS.

В одном варианте осуществления NLS представляет собой один из NLS, который эндогенно присутствует в последовательности Мус, такой как пептид M1 (PAAKRVKLD, SEQ ID NO: 56) или пептид M2 (RQRRNELKRSF, SEQ ID NO: 57).

В другом варианте осуществления дополнительный NLS представляет собой NLS, который отличается от эндогенного NLS, имеющегося в полипептиде, содержащем SEQ ID NO: 1, или в функционально эквивалентном варианте SEQ ID NO: 1.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат, в дополнение к эндогенному NLS, имеющемуся в полипептиде по изобретению или в его функционально эквивалентном варианте, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 NLS.

В другом конкретном варианте осуществления полипептид конъюгата, используемого по изобретению, связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через первый гибкий пептидный линкер и с NLS через второй гибкий пептидный линкер.

Используемый в настоящем документе термин «гибкий пептид», «пептидный спейсер» или «пептидный линкер» означает пептид, который ковалентно связывает два белка или фрагмента, но который не является частью ни одного из полипептидов, допускает движение одного из них относительно другого без оказания существенного разрушительного действия на функцию белка или фрагмента. Таким образом, гибкий линкер не влияет на способность к мечению опухоли последовательности полипептида, способность к проникновению в клетку проникающего в клетку пептида или на способность к ядерной локализации NLS.

Гибкий пептид содержит по меньшей мере одну аминокислоту, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот,

по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 12 аминокислот, по меньшей мере 14 аминокислот, по меньшей мере 16 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 60 аминокислот, по меньшей мере 70 аминокислот, по меньшей мере 80 аминокислот, по меньшей мере 90 аминокислот или примерно 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гибкий пептид допускает движение одного белка относительно другого для повышения растворимости белка и/или повышения его активности. Соответствующие области линкера включают полиглициновую область, последовательность GPRRRR (SEQ ID NO: 58) из сочетаний остатков глицина, пролина и аланина.

В конкретном варианте осуществления конъюгаты, используемые по изобретению, содержат метку, связанную с конъюгатом, либо с С-концевым или N-концевым доменом указанного полипептида или слитого белка, или его варианта. Указанная метка, как правило, представляет собой пептидную или аминокислотную последовательность, которая может быть использована при выделении или очистке указанного слитого белка. Так, указанная метка способна связываться с одним или более лигандами, например, одним или более лигандами аффинной матрицы, такой как носитель или гранулы для хроматографии, с высокой аффинностью. Примером указанной метки является гистидиновая метка (His-метка или НТ), например, метка, содержащая 6 остатков гистидина (His₆ или Н6), которая может связываться с никелевой (Ni²⁺) или кобальтовой (Co²⁺) колонкой с высокой аффинностью. His-метка имеет полезное свойство, заключающееся в том, что она может связывать свои лиганды в условиях, которые являются денатурирующими для большинства белков и разрушительными для большинства белок-белковых взаимодействий. Таким образом, ее можно использовать для удаления белка-приманки, меченого Н6, после нарушения белок-белковых взаимодействий, в которых участвовала приманка.

Дополнительные иллюстративные неограничивающие примеры меток, полезных для выделения или очистки конъюгата или полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1, или его варианта, или слитого белка, включают Arg-метку, FLAG-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 59), Strep-метку (WSHPQFEK, SEQ ID NO: 60), эпитоп, который может быть узнан антителом, например, с-тус-метку (узнаваемую анти-с-тус антителом), HA-метку (YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 61), V5-метку (GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO: 62), SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлоза-связывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-S-трансферазную метку, мальтоза-связывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку и так далее (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), аминокислотную последовательность, такую как ANGHRP (SEQ ID NO: 63) или PINDHDNPHLVINSGMTCXXC (SEQ ID NO: 64), β-галактозидазу и тому

подобное.

Метка может быть использована, при необходимости, для выделения или очистки указанного слитого белка.

В другом предпочтительном варианте осуществления соединение (i) по изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид или слитый белок, описанные выше. В предпочтительном варианте осуществления соединения (i) по изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант. В другом варианте осуществления соединения (i) по изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта; более предпочтительно представляет собой полинуклеотид, кодирующий слитый белок из полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта и последовательности проникающего в клетку пептида.

Термины «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо и означают полимерные формы любой длины из нуклеотидов. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или их аналоги. Нуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру, и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Термин «полинуклеотид» охватывает, например, одноцепочечные, двухцепочечные и тройные спиральные молекулы, ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК с любой последовательностью, выделенную РНК с любой последовательностью, нуклеотидные зонды и праймеры. Помимо природной молекулы нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может включать модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты. Используемый в настоящем документе термин «мРНК» означает РНК, которая может транслироваться в клетке.

В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК.

мРНК может быть химически синтезирована, может быть получена путем *in vitro* транскрипции или может быть синтезирована *in vivo* в клетке-мишени. Нуклеотидные последовательности, образующие полинуклеотид, кодирующий конъюгат или слитый белок по изобретению, находятся в одной и той же правильной рамке считывания для их экспрессии.

В предпочтительном варианте осуществления компонент (i) комбинации по изобретению представляет собой мРНК, кодирующую полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1, или полипептид, состоящий из функционально

эквивалентного варианта SEQ ID NO: 1, или полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 4.

В другом варианте осуществления компонент (i) комбинации по изобретению представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид по изобретению.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» означает нуклеотидную последовательность, содержащую необходимые последовательности, так, что после транскрибирования и трансляции указанных последовательностей в клетке образуется полипептид, кодируемый полинуклеотидом по изобретению. Указанная последовательность функционально связана с дополнительными сегментами, обеспечивающими ее автономную репликацию в интересующей клетке-хозяине. Предпочтительно, вектор представляет собой экспрессионный вектор, определяемый как вектор, который помимо областей для автономной репликации в клетке-хозяине, содержит области, функционально связанные с нуклеиновой кислотой по изобретению, которые способны повышать экспрессию продуктов нуклеиновой кислоты по изобретению. Векторы по изобретению могут быть получены методами, широко известными в данной области.

Примеры векторов включают, но без ограничения, вирусные векторы, экспрессионные векторы, представляющие собой голую ДНК или РНК, плазмиды, космиды или фаговые векторы, экспрессионные векторы, представляющие собой ДНК или РНК, ассоциированную с катионными конденсирующими средствами, экспрессионные векторы, представляющие собой ДНК или РНК, инкапсулированную в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты. Подходящие векторы, содержащие полинуклеотид по изобретению, представляют собой векторы, полученные из экспрессионных векторов в прокариотах, например, pUC18, pUC19, pBluescript и их производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаги и «челночные» векторы, например, pSA3 и pAT28, экспрессионные векторы в дрожжах, например, векторы типа 2-микронной плазмиды, интегрирующие плазмиды, YEP векторы, центромерные и аналогичные плазмиды, экспрессионные векторы в клетках насекомых, например, векторы серии pAC и серии pVL, экспрессионные векторы в растениях, например, векторы серий pIB1, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE и аналогичные, и экспрессионные векторы в клетках высших эукариот, основанные на вирусных векторах (аденовирусе, вирусе, ассоциированном с аденовирусом, а также ретровирусе и, в частности, лентивирусе), а также невирусной векторы, например, pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d и pTDT1. В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению находится в векторе, выбранном из группы, состоящей из ретровирусных векторов pEGFP или pVabe и лентивирусных векторов pTRIPZ или pSLIK.

Вектор по изобретению может быть использован для трансформации, трансфекции или инфекции клеток, которые могут быть трансформированы, трансфицированы или

инфицированы указанным вектором. Указанные клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими.

Вектор предпочтительно содержит полинуклеотид по изобретению, функционально связанный с последовательностями, регулирующими экспрессию полинуклеотида по изобретению. Регуляторные последовательности, используемые по настоящему изобретению, могут представлять собой ядерные промоторы или, альтернативно, последовательности энхансера и/или другие регуляторные последовательности, которые увеличивают экспрессию гетерологичной нуклеотидной последовательности. В принципе, по настоящему изобретению можно использовать любой промотор при условии, что указанный промотор совместим с клетками, в которых полинуклеотид должен быть экспрессирован. Таким образом, промоторы, подходящие для реализации настоящего изобретения, включают, но не обязательно ограничиваются ими, конститутивные промоторы, например, происходящие из геномов эукариотических вирусов, например, вируса полиомы, аденовируса, SV40, CMV, вируса саркомы птиц, вируса гепатита В, промотор гена металлотионеина, промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса, области LTR ретровирусов, промотор гена иммуноглобулина, промотор гена актина, промотор гена EF-1 альфа, а также индуцируемые промоторы, в случае которых экспрессия белка зависит от добавления молекулы или экзогенного сигнала, например, системы тетрациклина, система NF- κ B/ультрафиолетовый свет, система Cre/Lox и промотор генов теплового шока, регулируемые промоторы РНК-полимеразы II, описанные в WO/2006/135436, и тканеспецифичные промоторы.

В другом варианте осуществления компонент (i) комбинации по изобретению представляет собой клетку, способную секретировать в среду полипептид по изобретению или конъюгат по изобретению, предпочтительно полипептид по изобретению или слитый белок по изобретению.

Подходящие клетки, способные секретировать полипептид по изобретению, включают, без ограничения, кардиомиоциты, адипоциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, лимфоциты (В и Т-клетки), мастоциты, эозинофилы, клетки интимы сосудов, первичные культуры из выделенных клеток различных органов, предпочтительно из клеток, выделенных из островков Лангерганса, гепатоциты, лейкоциты, включая мононуклеарные лейкоциты, мезенхимальные, из пуповины или взрослых (кожи, легких, почки и печени), остеокласты, хондроциты и другие клетки соединительной ткани. Подходящими также являются клетки стабилизированных линий, такие как Т-клетки Jurkat, NIH-3T3, CHO, Cos, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, клетки 3T3, миобласты C2C12 и клетки W138. Специалисты в данной области понимают, что клетки, способные секретировать в среду полипептид по изобретению, могут быть использованы в сформированных микрочастицах или микрокапсулах, чтобы клетки имели больший срок службы у пациентов. Материалы, пригодные для формирования объекта из микрочастиц по изобретению, включают любой биосовместимый полимерный материал, допускающий постоянную секрецию терапевтических продуктов и служащий подложкой

для клеток. Таким образом, указанный биосовместимый полимерный материал может представлять собой, например, термопластичные полимеры или водосодержащие полимеры. В число термопластичных полимеров входят акриловая кислота, акриламид, 2-аминоэтилметакрилат, поли(тетрафторэтилен-когексафторпропилен), метакриловая(7-кумарокси)этиловая эфирная кислота, N-изопропилакриламид, полиакриловая кислота, полиакриламид, полиамидоамин, поли(амино)-п-ксилилен, поли(хлорэтилвинилэфир), поликапролактон, поли(капролактон-со-триметиленкарбонат), поли(карбонат мочевины) уретан, поли(карбонат) уретан, полиэтилен, сополимер полиэтилена и акриламида, полиэтиленгликоль, метакрилат полиэтиленгликоля, поли(этилентерефталат), поли(4-гидроксibuтилакрилат), поли(гидроксиэтилметакрилат), поли(N-2-гидроксипропилметакрилат), поли(молочная-гликолевая кислота), поли(L-молочная кислота), поли(гамма-метил, L-глутамат), поли(метилметакрилат), поли(пропиленфумарат), поли(пропиленоксид), полипиррол, полистирол, поли(тетрафторэтилен), полиуретан, поливиниловый спирт, полиэтилен сверхвысокой молекулярной массы, 6-(п-винилбензамид)-гексановая кислота N-пвинибензил-D-мальтонамид и сополимеры, содержащие более одного из указанных полимеров. В число полимеров гидрогелевого типа входят натуральные материалы из альгината, агарозы, коллагена, крахмала, гиалуроновой кислоты, бычьего сывороточного альбумина, целлюлозы и их производных, пектина, хондроитин сульфата, фибрина и фиброина, а также синтетические гидрогели, такие как сефароза[®] и сефадекс[®].

Соединение (ii) комбинации по изобретению представляет собой иммуноонкологическое средство.

Используемый в настоящем документе термин «иммуноонкологическое средство» означает средство, которое эффективно усиливает, стимулирует и/или активизирует иммунные ответы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение иммуноонкологического средства с соединением (i) комбинации по изобретению обладает синергическим эффектом при лечении рака.

Иммуноонкологическое средство может представлять собой, например, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, либо биологическую или малую молекулу. Примеры биологических иммуноонкологических средств включают, но без ограничения, противораковые вакцины, антитела и цитокины. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является гуманизированным или человеческим.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой цитокин.

«Цитокины» представляют собой пептиды с разными размерами и молекулярной массой, которые синтезируют клетки иммунной системы для регуляции иммунного ответа, и они могут представлять собой гормоны, факторы роста, факторы некроза, хемокины и так далее. Они могут быть естественного происхождения или происходить из

культур рекомбинантных клеток, и быть биологически активными эквивалентами природных последовательностей цитокинов. Иллюстративные цитокины могут представлять собой цитокины, ингибирующие Т-клеточную активацию, такие как IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF и другие иммуносупрессорные цитокины; или цитокины, стимулирующие Т-клеточную активацию для стимуляции иммунного ответа. Их конъюгация с антителами приводит к образованию иммуноцитокинов. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой рекомбинантный человеческий интерлейкин 15 (rhIL-15), рекомбинантный человеческий интерлейкин 12 (rhIL-12), например, NM-IL-12 (Neumedicines, Inc.) или гетеродимерный IL-15 (hetIL-15, Novartis/Admune), слитый комплекс, состоящий из синтетической формы эндогенного IL-15 в сочетании с растворимым IL-15-связывающим белком альфа-цепью рецептора IL-15 (IL15:sIL-15RA).

В другом варианте осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-гамма, IL-1 альфа/IL-1F1, IL-1 бета/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F гетеродимер, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, TL-32 бета, IL-32 гамма, IL-33, LAP (TGF-бета 1), лимфотоксин-альфа/TNF-бета, TGF-бета, TNF-альфа, TRANCE/TNFSFII/RANKL, и любое их сочетание.

В предпочтительном варианте осуществления иммуноонкологическое средство не является цитокином. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления цитокины исключены из объема настоящего изобретения. Предпочтительно, цитокины, исключенные из настоящего изобретения, представляют собой TNF-альфа, INF-гамма, GM-CSF фактор и IL-2.

В другом предпочтительном варианте осуществления цитокины исключены из объема настоящего изобретения только, когда компонент (i) комбинации представляет собой компонент (i)(a) или (i)(b). Таким образом, в варианте осуществления, если компонент (i) комбинации представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант, или конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта, то иммуноонкологическое средство не является цитокином, предпочтительно не является цитокином, выбранным из группы, состоящей из TNF-альфа, INF-гамма, GM-CSF фактора и IL-2.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой (i) агонист стимулирующего (включая костимулирующий) рецептора или (ii) антагонист ингибирующего (включая коингибирующий) сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов.

Некоторые из стимулирующих и ингибирующих молекул являются членами

суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Одним важным семейством связанных с мембраной лигандов, которые связывают костимулирующие или коингибирующие рецепторы, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6.

Другим семейством связанных с мембраной лигандов, которые связывают костимулирующие или коингибирующие рецепторы, является семейство TNF молекул, которые связываются с членами родственного семейства TNF-рецепторов, включающего CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения (i) по изобретению и иммуноонкологического средства может стимулировать Т-клеточные ответы. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой: (i) антагонист белка, ингибирующего Т-клеточную активацию (например, ингибитора иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4; или (ii) агонист белка, стимулирующего Т-клеточную активацию, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонист активирующих рецепторов на NK-клетках. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист KIR, такой как лирилумаб.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой средство, которое ингибирует или истощает макрофаги или моноциты, включая, но без ограничения, антагонисты CSF-1R, например, антитела-антагонисты CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249, WO13169264, WO14/036357).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из средств-агонистов, которые связываются с позитивными костимулирующими рецепторами, блокирующих средств, которые ослабляют сигнализацию через ингибирующие рецепторы, антагонистов, а также одного или более средств, которые повышают системную частоту встречаемости противоопухолевых Т-клеток, средств, которые преодолевают различные иммуносупрессорные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют связывание ингибирующего рецептора (например, взаимодействия

PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, использование анти-CD25 моноклонального антитела (например, даклизумаба) или *ex vivo* истощение за счет анти-CD25 гранул), ингибируют метаболические ферменты, например, IDO, или обращают вспять/предотвращают анергию или истощение Т-клеток), а также средств, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в зоне опухоли.

Используемый в настоящем документе термин «белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами» (сокращенно «CTLA-4», также известный как кластер дифференцировки 152 (CD152)) означает белковый рецептор, действующий в качестве иммунной контрольной точки. CTLA-4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется активированными Т-клетками и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA-4 является гомологичным Т-клеточному костимулирующему белку, CD28, и обе молекулы связывают CD80 и CD86, также называемые В7-1 и В7-2, соответственно, на антигенпредставляющих клетках. CTLA-4 связывает CD80 и CD86 с большей аффинностью и авидностью, чем CD28, что позволяет ему вытеснять CD28 из связывания с его лигандами. CTLA-4 передает ингибирующий сигнал Т-клеткам, в то время как CD28 передает стимулирующий сигнал. CTLA-4 также присутствует в регуляторных Т-клетках (Treg) и участвует в их ингибирующей функции. Т-клеточная активация через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к повышению экспрессии CTLA-4. Белок CTLA-4 закодирован геном CTLA-4 у человека (регистрационный номер Ensembl: ENSG00000163599). Как правило, после активации Т-клеток экспрессия CTLA-4 повышается на плазматической мембране, где его функция заключается в понижающей регуляции функции Т-клеток с помощью различных механизмов, включая предотвращение костимуляции за счет вытеснения CD28 из связывания с его лигандом, В7, а также за счет индукции остановки Т-клеточного цикла (Postow et al. (2015) *J. Clinical oncology*, Vol. 33, pages 1974-1983; Pardoll, D. et al. (2012), *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CTLA-4. Используемый в настоящем документе термин «антагонист CTLA-4» относится, без ограничения, к любому химическому соединению или средству, или биологической молекуле, которое блокирует связывание CTLA-4 с его лигандами В7-1 и/или В7-2. В контексте настоящего изобретения, понятно, что, когда субъект (например, отдельный человек) получает лечение антагонистом CTLA-4 (например, анти-CTLA-4 антителом), антагонист CTLA-4 блокирует связывание (человеческого) CTLA-4 с (человеческим) В7-1 и/или В7-2.

Неограничивающие примеры соединений-антагонистов CTLA-4, которые в настоящее время рассматриваются для клинического применения в лечении рака, включают антагонистические антитела к CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антагонистическое анти-CTLA-4 антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое анти-CTLA-4 антитело представляет собой ервой (ипилимумаб) или

тремелимумаб.

Другие неограничивающие примеры антагонистов CTLA-4 включают иммуноадгезины (также известные как слитые белки), которые представляют собой соединения, способные специфически связывать CTLA-4 и блокировать его связывание с B7-1 и/или B7-2.

Используемый в настоящем документе термин рецептор «программируемой гибели клеток 1 (PD-1)» относится к ингибирующему иммунному рецептору, принадлежащему к семейству CD28. У человека PD-1 закодирован геном PDCD1. PD-1 экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывает два лиганда, PD-L1 и PD-L2. Используемый в настоящем документе термин «PD-1» охватывает человеческий PD-1 (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1, а также аналоги, имеющие по меньшей мере общий эпитоп с hPD-1. Полную последовательность hPD-1 можно найти под регистрационным № GENBANK U64863. PD-1 экспрессируется на иммунocyтах, таких как активированные Т-клетки (включая эффекторные Т-клетки), В-клетки, миелоидные клетки, тимоциты и клетки - естественные киллеры (NK) (Suya Dai et al., (2014) Cellular Immunology, Vol:290, pages 72-79; Gianchecchi et al., (2013), Autoimmun. Rev. 12 1091-1100).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист PD-1. Используемый в настоящем документе термин «антагонист PD-1» относится, без ограничения, к любому химическому соединению или средству, или биологической молекуле (например, антителу), которое блокирует связывание PD-L1, экспрессируемого на раковой клетке, с PD-1, экспрессируемым на иммунocyте (Т-клетке, В-клетке или НКТ-клетке), и/или блокирует связывание PD-L2, экспрессируемого на раковой клетке, с экспрессируемым на иммунocyте PD-1. В контексте настоящего изобретения понятно, что, когда субъект (например, отдельный человек) получает лечение антагонистом PD-1 (например, анти-PD-1 антителом), антагонист PD-1 блокирует связывание (человеческого) PD-L1 с (человеческим) PD-1, или блокирует связывание (человеческого) PD-L2 с (человеческим) PD-1, и предпочтительно блокирует связывание обоих (человеческих) PD-L1 и PD-L2 с (человеческим) PD-1. Аминокислотные последовательности человеческого PD-1 можно найти в NCBI локус №: NP_005009. Аминокислотные последовательности человеческих PD-L1 и PD-L2 можно найти в NCBI локус №: NP_054862 и NP_079515, соответственно.

Неограничивающими примерами антагонистов PD-1 являются антитела к PD-1 (также называемые антителами против PD-1 или анти-PD-1 антителами), такие как, например, анти-PD-1 моноклональное антитело (mAb), или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD-1, и предпочтительно специфически связывает человеческий PD-1. mAb может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело, и может включать человеческую константную область. Неограничивающие примеры соединений-антагонистов PD-1 включают анти-PD-1 антитела, такие как ниволумаб (опдиво (R), Bristol-Myers Squibb),

пембролизумаб (кейтруда (R), Merck), BGB-A317 и другие, например, PDR001 (Novartis). Другие неограничивающие примеры антагонистов PD-1 включают пидилизумаб (Cure Tech), AMP-224 (GlaxoSmithKline), AMP-514 (GlaxoSmithKline), PDR001 (Novartis) и цемиплимаб (Regeneron и Sanofi). Другие антагонисты PD-1 также включают любое анти-PD-1 антитело, описанное в US8008449, US7521051 и US8354509.

Другие неограничивающие примеры антагонистов PD-1 включают иммуноадгезины (также известные как слитые белки), которые представляют собой соединения, способные специфически связывать PD-1 и блокировать его связывание с PD-L1. Примеры молекул иммуноадгезинов, которые специфически связывают PD-1, приведены в WO2010/027827, US2016/0304969 и WO2011/066342. Например, неограничивающим примером слитых белков, которые могут быть использованы в качестве антагонистов PD-1 по настоящему изобретению, является AMP-224 (который представляет собой рекомбинантный Fc-слитый белок B7-DC, состоящий из внеклеточного домена лиганда 2 рецептора программируемой гибели клеток PD-1 (PD-L2, B7-DC) и Fc-области человеческого иммуноглобулина (Ig) G1).

Используемый в настоящем документе термин «антитело» (например, анти-PD-1 антитело и анти-CTLA-4 антитело) относится к любым формам антитела и его фрагменту(ам), которые проявляют нужную биологическую или связывающую активность (например, блокирование связывания PD-1 с его лигандами или блокирование связывания CTLA-4 с его лигандами, как описано выше). Таким образом, он используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела) и их фрагменты, поликлональные антитела и их фрагменты, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и их фрагменты, гуманизированные, полностью человеческие антитела и их фрагменты, химерные антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела верблюдовых и их фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает рецептор программируемой гибели клеток 1 (PD-1) и ингибирует активность PD-1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 представляет собой антагонистическое анти-PD-1 антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое анти-PD-1 антитело представляет собой опдиво (ниволумаб), кетруда (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство может представлять собой пидилизумаб (CT-011). В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-областью IgG1, под названием AMP-224.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 представляет собой антагонистическое анти-PD-L1 антитело. В некоторых

вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой MPDL3280A (RG7446; WO2010/077634), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874) и MSB0010718C (WO2013/79174).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист LAG-3. В некоторых вариантах осуществления антагонист LAG-3 представляет собой антагонистическое анти-LAG-3 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело представляет собой BMS-986016 (WO10/19570, WO14/08218) или IMP-731, или IMP-321 (WO08/132601, WO009/44273).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD137 (4-1BB). В некоторых вариантах осуществления агонист CD137 (4-1BB) представляет собой агонистическое анти-CD137 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой агонист GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист GITR представляет собой агонистическое анти-GITR антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO006/105021, WO009/009116) или МК-4166 (WO11/028683).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист индоламин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В некоторых вариантах осуществления антагонист IDO выбран из эпакадостата (INCB024360, Incyte); индоксимода (NLG-8189, NewLink Genetics Corporation); капманитиба (INC280, Novartis); GDC-0919 (Genentech/Roche); PF-06840003 (Pfizer); BMS:F001287 (Bristol-Myers Squibb); Phy906/KD108 (Phytoceutica); фермента, расщепляющего кинуренин (Kynase, Kyn Therapeutics), и NLG-919 (WO09/73620, WO009/1156652, WO11/56652, WO12/142237).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой агонист OX40. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-OX40 антитело представляет собой MEDI-6383 или MEDI-6469.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист OX40L. В некоторых вариантах осуществления антагонист OX40L представляет собой антагонистическое анти-OX40L антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист OX40L представляет собой RG-7888 (WO06/029879).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD40. В некоторых вариантах осуществления агонист CD40 представляет собой агонистическое анти-CD40 антитело. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CD40. В некоторых вариантах осуществления антагонист CD40 представляет собой антагонистическое анти-CD40 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-

CD40 антитело представляет собой лукатумумаб или дацетузумаб.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD27. В некоторых вариантах осуществления агонист CD27 представляет собой агонистическое анти-CD27 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-CD27 антитело представляет собой варлилумаб.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой MGA271 (к В7Н3) (WO11/109400).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой абаговомаб, адекатумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, анатумомаб мафенатокс, аполизумаб, атезолимаб, авелумаб, блинатумомаб, BMS-936559, катумаксомаб, дурвалумаб, эпакадостат, эпратузумаб, индоксимод, инотузумаб озогамин, интелумумаб, ипилимумаб, исатуксимаб, ламбролизумаб, MED14736, MPDL3280A, ниволумаб, обинутузумаб, окаратузумаб, офатумумаб, олататумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, ритуксимаб, тицилимумаб, самализумаб или тремелимумаб.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой иммуностимулирующее средство. Например, антитела, блокирующие ингибиторную ось PD-1 и PD-L1, могут приводить к высвобождению активированных опухоль-реактивных Т-клеток, и, как показано в клинических испытаниях, индуцируют долговременные противоопухолевые ответы в растущем числе гистологических типов опухолей, включая некоторые виды опухолей, которые обычно считали невосприимчивыми к иммунотерапии. Анти-PD-1 антитело ниволумаб (опдиво[®], Bristol-Myers Squibb, также известное как ONO-4538, MDX1106 и BMS-936558) продемонстрировало потенциал в улучшении показателей общей выживаемости у пациентов с ПКК, у которых произошло прогрессирование заболевания во время или после предшествующей антиангиогенной терапии.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее терапевтическое средство специфически индуцирует апоптоз опухолевых клеток. Одобренные к применению иммуномодулирующие терапевтические средства, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают помалидомид (помалист[®], Celgene); леналидомид (ревлимид[®], Celgene); ингенол мebutат (пикато[®], LEO Pharma).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой противораковую вакцину. В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина выбрана из сипулейцел-Т (провендж[®], Dendreon/Valeant Pharmaceuticals) и талимоген лахерпарепвек (имлигик[®], BioVex/Amgen, прежнее название Т-VEC). В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из онколитического вирусного терапевтического средства, такого как пексастимоген девацирепвек (пексавек/JX-594, SillaJen/прежнее название Jennerex Biotherapeutics), пелареореп (реолизин[®], Oncolytics Biotech), энаденотуцирев (NG-348, псиоксус, прежнее название ColoAd1), ONCOS-102 (тарговакс/прежнее название онкос), вирусы

осповакцины, генетически модифицированные для экспрессии бета-галактозидазы (бета-gal)/бета-глюкоронидазы и/или бета-gal/человеческого натрий-иодидного симпортера (hNIS), например, GL-ONC1 (GLV-1h68/GLV-1h153, Genelux GmbH), а также аденовирус, генетически модифицированный для экспрессии GM-CSF, например, CG0070 (Cold Genesys).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из JX-929 (SillaJen/прежнее название Jennerex Biotherapeutics), TG01 и TG02 (тарговакс/прежнее название онкос), TILT-123 (TILT Biotherapeutics) и VSV-GP (ViraTherapeutics).

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой Т-клетку, генетически модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, или CAR. Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии такого химерного антигенного рецептора, называют CAR-Т-клетки. Сконструированы CAR, состоящие из связывающих доменов, которые могут быть получены из естественных лигандов, одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, специфических для клеточных поверхностных антигенов, слитых с эндодоменами, которые представляют собой функциональный конец Т-клеточного рецептора (TCR), такими как сигнальный домен CD3-дзета из TCR, который способен генерировать сигнал активации в Т-лимфоцитах. После связывания антигена такие CAR связываются с эндогенными сигнальными путями в эффекторной клетке и генерируют активирующие сигналы, аналогичные тем, которые инициируются комплексом TCR.

Например, в некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетка представляет собой одну из клеток, описанных в патенте США 8906682 (June; включен посредством ссылки в полном объеме), в котором описаны CAR-Т-клетки, генетически модифицированные для содержания внеклеточного домена, имеющего антигенсвязывающий домен (такой как домен, который связывает CD19), слитый с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи Т-клеточного антигенного рецепторного комплекса (такой как CD3-дзета). При экспрессии в Т-клетке CAR способен перенаправлять узнавание антигена в зависимости от специфичности связывания антигена. В случае CD19 антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. Более 200 клинических испытаний проводят в настоящее время с использованием CAR-Т при широком диапазоне заболеваний. [<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chimeric+antigen+receptors&pg=1>].

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой активатор ретиноевого орфан-рецептора γ (ROR γ t). ROR γ t представляет собой фактор транскрипции, играющий ключевые роли в дифференциации и поддержании эффекторных типа 17 подгрупп CD4⁺ (Th17) и CD8⁺ (Tc17) Т-клеток, а также в дифференциации экспрессирующих IL-17 субпопуляций клеток врожденного иммунитета, таких как NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления активатор

ROR γ t представляет собой LYC-55716 (Lycera), который в настоящее время оценивают в клинических испытаниях для лечения солидных опухолей (NCT02929862).

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой агонист или активатор toll-подобного рецептора (TLR). Подходящие активаторы TLR включают агонист или активатор TLR9, такой как SD-101 (Dynavax). Агонисты или активаторы TLR8, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают мотолимод (VTX-2337, VentiRx Pharmaceuticals).

Другие иммуноонкологические средства, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), анти-CD137 моноклональное антитело; варлилумаб (CDX-1127, Celldex Therapeutics), анти-CD27 моноклональное антитело; BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb), анти-OX40 моноклональное антитело; лирилумаб (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma, Bristol-Myers Squibb), анти-KIR моноклональное антитело; монализумаб (IPH2201, Innate Pharma, AstraZeneca), анти-NKG2A моноклональное антитело; андекаликсимаб (GS-5745, Gilead Sciences), анти-MMP9 антитело; МК-4166 (Merck & Co.), анти-GITR моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство выбрано из элутумаба, мифамуртида, агониста или активатора toll-подобных рецепторов и активатора ROR γ t.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из средств, описанных в публикации Jerry L. Adams et al., «Big opportunities for small molecules in immuno-oncology», *Cancer Therapy* 2015, Vol. 14, pages 603-622, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из примеров, приведенных в Таблице 1 публикации Jerry L. Adams et al. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой малую молекулу, нацеленную на иммуноонкологическую мишень, выбранную из тех, которые приведены в Таблице 2 публикации Jerry L. Adams et al. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой низкомолекулярное средство, выбранное из средств, приведенных в Таблице 2 публикации Jerry L. Adams et al.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из низкомолекулярных иммуноонкологических средств, описанных в публикации Peter L. Toogood, «Small molecule immuno-oncology therapeutic agents», *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2018, Vol. 28, pages 319-329, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой средство, нацеленное на пути, описанные в публикации Peter L. Toogood.

В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство выбрано из средств, описанных в публикации Sandra L. Ross et al., «Bispecific T cell engager (BiTE[®])

antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing», PLoS ONE 12(8): e0183390, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой конструкцию биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BiTE[®]). В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифического антитела, активирующего Т-клетки, представляет собой конструкцию биспецифического анти-CD19/CD3 антитела. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BiTE[®]), представляет собой конструкцию биспецифического анти-EGFR/CD3 антитела. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BiTE[®]), активирует Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BiTE[®]), активирует Т-клетки, которые высвобождают цитокины, индуцирующие повышающую регуляцию молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и FAS на посторонних клетках. В некоторых вариантах осуществления конструкция биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BiTE[®]), активирует Т-клетки, что приводит к индуцированному лизису посторонних клеток. В некоторых вариантах осуществления посторонние клетки находятся в солидных опухолях. В некоторых вариантах осуществления посторонние клетки, подвергаемые лизису, находятся в непосредственной близости от BiTE[®]-активированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления посторонние клетки включают не содержащие опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления посторонние клетки включают не содержащие EGFR раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антитело, которое блокирует ось PD-L1/PD1 и/или CTLA4. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой ex-vivo размноженные опухоль-инфильтрирующие Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой конструкцию биспецифического антитела или химерные антигенные рецепторы (CAR), которые непосредственно связывают Т-клетки с опухоль-ассоциированными поверхностными антигенами (ТАА).

В другом варианте осуществления иммуноонкологическое средство комбинации по изобретению представляет собой антагонист белка, ингибирующего Т-клеточную активацию, или ингибитор иммунных контрольных точек.

Используемый в настоящем документе термин «ингибитор контрольных точек» относится к средствам, которые могут быть использованы для предотвращения уклонения раковых клеток от иммунной системы пациента. Один из основных механизмов нарушения противоопухолевого иммунитета известен как «истощение Т-клеток», которое возникает в результате хронического воздействия антигенов, приводящего к повышению экспрессии ингибирующих рецепторов. Эти ингибирующие рецепторы служат в качестве иммунных контрольных точек для предотвращения неконтролируемых иммунных

реакций.

PD-1 и коингибирующие рецепторы, такие как антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4, аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA; CD272), домен иммуноглобулина Т-клеток и домен муцина содержащий белок 3 (Tim-3), белок гена 3 активации лимфоцитов (Lag-3; CD223) и другие, часто называют регуляторами контрольных точек. Они действуют в качестве молекулярных «привратников», позволяющих внеклеточной информации определять, должен ли продолжаться клеточный цикл и другие внутриклеточные сигнальные процессы.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело к PD-1. Анти-PD-1 антитело связывается с рецептором программируемой гибели клеток 1 (PD-1), предотвращая связывание рецептора с ингибирующим лигандом PDL-1, таким образом, обеспечивая преодоление способности опухолей подавлять противоопухолевый иммунный ответ хозяина.

В одном аспекте ингибитор контрольных точек представляет собой биологическое терапевтическое средство или малую молекулу. В другом аспекте ингибитор контрольных точек представляет собой моноклональное антитело, гуманизованное антитело, полностью человеческое антитело, слитый белок или их сочетание. В следующем аспекте ингибитор контрольных точек ингибирует белок контрольных точек, выбранный из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 семейства лигандов или их сочетания. В дополнительном аспекте ингибитор контрольных точек взаимодействует с лигандом белка контрольных точек, выбранного из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 семейства лигандов или их сочетания. В одном из аспектов ингибитор контрольных точек представляет собой иммуностимулирующее средство, фактор роста Т-клеток, интерлейкин, антитело, вакцину или их сочетание. В следующем аспекте интерлейкин представляет собой IL-7 или IL-15. В конкретном аспекте интерлейкин представляет собой гликозилированный IL-7. В дополнительном аспекте вакцина представляет собой вакцину на основе дендритных клеток (DC).

Ингибиторы контрольных точек включают любое средство, которое блокирует или ингибирует статистически значимым образом пути, ингибирующие иммунную систему. Такие ингибиторы могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают и блокируют или ингибируют рецепторы иммунных контрольных точек, или антитела, которые связывают и блокируют или ингибируют лиганды рецепторов иммунных контрольных точек. Иллюстративные молекулы контрольных точек, которые могут являться мишенью для блокирования или ингибирования, включают, но без ограничения, CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, LAG3, TIM3, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству CD2 молекул и экспрессируется на всех NK, $\gamma\delta$ и памяти CD8⁺ ($\alpha\beta$) Т-клетках), CD160 (также называемый BY55), CGEN-15049, CHK1 и CHK2 киназы, A2aR, а также

различные лиганды семейства В7. Лиганды семейства В7 включают, но без ограничения, В7-1, В7-2, В7-DC, В7-Н1, В7-Н2, В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5, В7-Н6 и В7-Н7. Ингибиторы контрольных точек включают антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, иные связывающие белки, биологические терапевтические средства или малые молекулы, которые связывают и блокируют или ингибируют активность одного или более из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунных контрольных точек включают тремелиумаб (CTLA-4-блокирующее антитело), анти-OX40, анти-PD-L1 моноклональное антитело (анти-В7-Н1; MEDI4736), МК-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (анти-PD1 антитело), CT-011 (анти-PD1 антитело), BY55 моноклональное антитело, AMP224 (анти-PDL1 антитело), BMS-936559 (анти-PDL1 антитело), MPLDL3280A (анти-PDL1 антитело), MSB0010718C (анти-PDL1 антитело) и ипилимумаб (анти-CTLA-4 ингибитор контрольных точек). Лиганды белков контрольных точек включают, но без ограничения, PD-L1, PD-L2, В7-Н3, В7-Н4, CD28, CD86 и TIM-3.

В конкретных вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антагониста PD-1, антагониста PD-L1 и антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек выбран из группы, состоящей из ниволумаба (опдиво[®]), ипилимумаба (ервой[®]) и пембролизумаба (кейтруда[®]). В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек выбран из ниволумаба (анти-PD-1 антитело, опдиво[®], Bristol-Myers Squibb); пембролизумаба (анти-PD-1 антитело, кейтруда[®], Merck); ипилимумаба (анти-CTLA-4 антитело, ервой[®], Bristol-Myers Squibb); дурвалумаба (анти-PD-L1 антитело, имфинзи[®], AstraZeneca) и атезолизумаба (анти-PD-L1 антитело, тецентрик[®], Genentech).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек выбран из группы, состоящей из ламбролизумаба (МК-3475), ниволумаба (BMS-936558), пидилизумаба (CT-011), AMP-224, MDX-1105, MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559, ипилимумаба, лирлумаба, IPH2101, пембролизумаба (кейтруда[®]) и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой REGN2810 (Regeneron), анти-PD-1 антитело, протестированное для пациентов с базально-клеточной карциномой (NCT03132636), НМПЛ (NCT03088540); плоскоклеточной карциномой кожи (NCT02760498), лимфомой (NCT02651662) и меланомой (NCT03002376); пидилизумаб (CureTech), также известный как CT-011, антитело, связывающее PD-1, протестированное в клинических испытаниях при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме и множественной миеломе; авелумаб (бавенсио[®], Pfizer/Merck KGaA), также известный как MSB0010718C), полностью человеческое анти-PD-L1 IgG1 антитело, протестированное в клинических испытаниях при немелкоклеточном раке легких, карциноме из клеток Меркеля, мезотелиоме, солидных опухолях, раке почек, раке яичников, раке мочевого пузыря, раке головы и шеи, а также раке желудка; или PDR001 (Novartis), ингибирующее антитело, связывающее PD-1, протестированное в клинических испытаниях при немелкоклеточном раке легких,

меланоме, тройном негативном раке молочной железы и запущенных или метастатических солидных опухолях. Тримерлимумаб (CP-675,206; AstraZeneca) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело против CTLA-4, которое было изучено в клинических испытаниях при целом ряде заболеваний, включая: мезотелиому, колоректальный рак, рак почки, рак молочной железы, рак легких и немелкоклеточный рак легких, аденокарциному протоков поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, герминогенный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, печеночно-клеточную карциному, рак предстательной железы, рак эндометрия, метастатический рак в печени, рак печени, крупноклеточную В-клеточную лимфому, рак яичника, рак шейки матки, метастатический анапластический рак щитовидной железы, рак уротелия, рак фаллопиевых труб, множественную миелому, рак мочевого пузыря, саркому мягких тканей и меланому. AGEN-1884 (Agenus) представляет собой анти-CTLA4 антитело, изучаемое в фазе 1 клинических испытаний при запущенных солидных опухолях (NCT02694822).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор домен иммуноглобулина Т-клеток и домен муцина содержащего белка 3 (TIM-3). Ингибиторы TIM-3, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают TSR-022, LY3321367 и MBG453. TSR-022 (Tesaro) представляет собой анти-TIM-3 антитело, изучаемое при солидных опухолях (NCT02817633). LY3321367 (Eli Lilly) представляет собой анти-TIM-3 антитело, изучаемое при солидных опухолях (NCT03099109). MBG453 (Novartis) представляет собой анти-TIM-3 антитело, изучаемое при запущенных злокачественных новообразованиях (NCT02608268).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM, или TIGIT, иммунорецептора на некоторых Т-клетках и NK-клетках. Ингибиторы TIGIT, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb), анти-TIGIT моноклональное антитело (NCT02913313); OMP-313M32 (Oncomed) и анти-TIGIT моноклональное антитело (NCT03119428).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор белка гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3). Ингибиторы LAG-3, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают BMS-986016 и REGN3767, и IMP321. BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), анти-LAG-3 антитело, изучают при глиобластоме и глиосаркоме (NCT02658981). REGN3767 (Regeneron) также представляет собой анти-LAG-3 антитело, и его изучают при злокачественных новообразованиях (NCT03005782). IMP321 (Immutep S.A.) представляет собой LAG-3-Ig слитый белок, изучаемый при меланоме (NCT02676869); аденокарциноме (NCT02614833) и метастатическом раке молочной железы (NCT00349934).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты OX40. Агонисты OX40, изучаемые в клинических испытаниях, включают PF-04518600/PF-8600 (Pfizer), агонистическое анти-OX40

антитело, при метастатическом раке почки (NCT03092856) и запущенных формах рака и новообразований (NCT02554812; NCT05082566); GSK3174998 (Merck), агонистическое анти-OX40 антитело, в фазе 1 испытаний противораковых средств (NCT02528357); MEDI0562 (Medimmune/AstraZeneca), агонистическое анти-OX40 антитело, при запущенных солидных опухолях (NCT02318394 и NCT02705482); MEDI6469, агонистическое анти-OX40 антитело (Medimmune/AstraZeneca), у пациентов с колоректальным раком (NCT02559024), раком молочной железы (NCT01862900), раком головы и шеи (NCT02274155) и метастатическим раком предстательной железы (NCT01303705); и BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb) агонистическое анти-OX40 антитело, при запущенных формах рака (NCT02737475).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты CD137 (также называемого 4-1BB). Агонисты CD137, изучаемые в клинических испытаниях, включают утомилумаб (PF-05082566, Pfizer), агонистическое анти-CD137 антитело, при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (NCT02951156) и при запущенных раковых заболеваниях и новообразованиях (NCT02554812 и NCT05082566); урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), агонистическое анти-CD137 антитело, при меланоме и раке кожи (NCT02652455), а также глиобластоме и глиосаркоме (NCT02658981).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты CD27. Агонисты CD27, изучаемые в клинических испытаниях, включают варлилумаб (CDX-1127, Celldex Therapeutics), агонистическое анти-CD27 антитело, при плоскоклеточном раке головы и шеи, карциноме яичников, колоректальном раке, почечно-клеточном раке и глиобластоме (NCT02335918), лимфомах (NCT01460134), а также глиоме и астроцитоме (NCT02924038).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты рецепторов глюкокортикоид-индуцируемого фактора некроза опухолей (GITR). Агонисты GITR, изучаемые в клинических испытаниях, включают TRX518 (Leap Therapeutics), агонистическое анти-GITR антитело, при злокачественной меланоме и других злокачественных солидных опухолях (NCT01239134 и NCT02628574); GWN323 (Novartis), агонистическое анти-GITR антитело, при солидных опухолях и лимфоме (NCT 02740270); INCAGN01876 (Incyte/Agenus), агонистическое анти-GITR антитело, при запущенных формах рака (NCT02697591 и NCT03126110); MK-4166 (Merck), агонистическое анти-GITR антитело, при солидных опухолях (NCT02132754) и MEDI1873 (Medimmune/AstraZeneca), агонистическую гексамерную молекулу GITR-лиганда с Fc-доменом человеческого IgG1, при запущенных солидных опухолях (NCT02583165).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS, также известного как CD278). Агонисты ICOS, изучаемые в клинических испытаниях, включают MEDI-570 (Medimmune), агонистическое анти-ICOS антитело, при лимфомах

(NCT02520791); GSK3359609 (Merck), агонистическое анти-ICOS антитело, в фазе 1 (NCT02723955); JTX-2011 (Jounce Therapeutics), агонистическое анти-ICOS антитело, в фазе 1 (NCT02904226).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают ингибиторы IgG-подобных рецепторов киллеров (KIR). Ингибиторы KIR, изучаемые в клинических испытаниях, включают лирилумаб (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb), анти-KIR антитело, при лейкозах (NCT01687387, NCT02399917, NCT02481297, NCT02599649), множественной миеломе (NCT02252263) и лимфоме (NCT01592370); IPH2101 (1-7F9, Innate Pharma) при миеломе (NCT01222286 и NCT01217203); и IPH4102 (Innate Pharma), анти-KIR антитело, которое связывается с тремя доменами длинного цитоплазматического «хвоста» (KIR3DL2), при лимфоме (NCT02593045).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают ингибиторы взаимодействия между CD47 и сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α). Ингибиторы CD47/SIRP α , изучаемые в клинических испытаниях, включают ALX-148 (Alexo Therapeutics), антагонистический вариант (SIRP α), который связывается с CD47 и предотвращает CD47/SIRP α -опосредуемую сигнализацию, в фазе 1 (NCT03013218); TTI-621 (SIRP α -Fc, Trillium Therapeutics), растворимый рекомбинантный слитый белок, созданный путем связывания N-концевого CD47-связывающего домена SIRP α с Fc-доменом человеческого IgG1, действует путем связывания человеческого CD47 и предотвращения передачи им сигнала макрофагам «не поедать», изучается в фазе 1 клинических испытаний (NCT02890368 и NCT02663518); CC-90002 (Celgene), анти-CD47 антитело, при лейкозах (NCT02641002) и Hu5F9-G4 (Forty Seven, Inc.) при колоректальных новообразованиях и солидных опухолях (NCT02953782), остром миелоидном лейкозе (NCT02678338) и лимфоме (NCT02953509). В предпочтительном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор CD47.

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают ингибиторы CD73. Ингибиторы CD73, изучаемые в клинических испытаниях, включают MEDI9447 (Medimmune), анти-CD73 антитело, при солидных опухолях (NCT02503774) и BMS-986179 (Bristol-Myers Squibb), анти-CD73 антитело, при солидных опухолях (NCT02754141).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают агонисты белка-стимулятора генов интерферона (STING, также известного как трансмембранный белок 173 или TMEM173). Агонисты STING, изучаемые в клинических испытаниях, включают МК-1454 (Merck), агонистический синтетический циклический динуклеотид, при лимфоме (NCT03010176) и ADU-S100 (MIW815, Aduro Biotech/Novartis), агонистический синтетический циклический динуклеотид, в фазе 1 (NCT02675439 и NCT03172936).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему

изобретению, включают ингибиторы CSF1R. Ингибиторы CSF1R, изучаемые в клинических испытаниях, включают пексидартиниб (PLX3397, Plexxikon), низкомолекулярный ингибитор CSF1R, при колоректальном раке, раке поджелудочной железы, метастатических и запущенных формах рака (NCT02777710) и меланоме, немелкоклеточном раке легких, плоскоклеточном раке головы и шеи, желудочно-кишечной стромальной опухоли (РЖКТ) и раке яичника (NCT02452424); и IMC-CS4 (LY3022855, Lilly), анти-CSF-1R антитело, при раке поджелудочной железы (NCT03153410), меланоме (NCT03101254) и солидных опухолях (NCT02718911); а также BLZ945 (4-[2((1R,2R)-2-гидроксициклогексиламино)бензотиазол-6-илокси]пиридин-2-карбоновой кислоты метиламид, Novartis), перорально принимаемый ингибитор CSF1R, при запущенных солидных опухолях (NCT02829723).

Ингибиторы контрольных точек, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают ингибиторы рецептора NKG2A. Ингибиторы рецептора NKG2A, изучаемые в клинических испытаниях, включают монализумаб (IPH2201, Innate Pharma), анти-NKG2A антитело, при новообразованиях головы и шеи (NCT02643550), а также хроническом лимфоцитарном лейкозе (NCT02557516).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек выбран из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или пидилизумаба.

В предпочтительном варианте осуществления антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, выбран из анти-PD-1 и анти-CTLA-4.

В предпочтительном варианте осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CTLA-4, предпочтительно анти-CTLA-4 антитело, более предпочтительно ипилимумаб или тремелимумаб.

В более предпочтительном варианте осуществления антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, представляет собой анти-PD-1. В предпочтительном варианте осуществления анти-PD-1 представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело, выбранное из группы, состоящей из опдиво (ниволумаб), кейтруда (пембролизумаб), MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493) и пидилизумаба (CT-011). В другом предпочтительном варианте осуществления анти-PD-1 представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-фрагментом IgG1, называемый AMP-224.

В одном из вариантов осуществления комбинация по изобретению представляет собой конъюгат между компонентом (i) и компонентом (ii) комбинации по изобретению, в частности, представляет собой конъюгат между полипептидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентным вариантом и иммуноонкологическим средством.

В некоторых вариантах осуществления конъюгацию между компонентами (i) и (ii) осуществляют через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления

конъюгацию между компонентами (i) и (ii) осуществляют через расщепляемый линкер. Иллюстративные нерасщепляемые линкеры и расщепляемые линкеры описаны в US8088387, US8142784, WO2013075048, US6630579, US8512707, US9120854, US9023351, US20160095938, US9446146, WO2005009369, US5773001, US6214345, US10111954, US8153768, US7829531, US20160082119, WO2018218004, US8568728, WO2015057699, US20170182181, US9198979, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически эффективное количество комбинации по изобретению совместно с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» означает препарат, адаптированный для введения заранее определенной дозы одного или нескольких терапевтически полезных средств в клетку, группу клеток, орган, ткань или животное, в организме которого имеет место неконтролируемое деление клеток, такое как рак.

Фармацевтическая композиция по изобретению содержит фармацевтически эффективное количество комбинации по изобретению и фармацевтически активный носитель. Фармацевтическая композиция по изобретению содержит полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентный вариант, конъюгат по изобретению, полинуклеотид, кодирующий полипептид или конъюгат, вектор, содержащий полинуклеотид, или клетку, способную секретировать в среду полипептид или конъюгат, и иммуноонкологическое средство. Подходящие функционально эквивалентные варианты полипептида с SEQ ID NO: 1, подходящие конъюгаты, слитые белки, полинуклеотиды, векторы или клетки для использования в фармацевтической композиции по изобретению являются такими, как описано выше.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически эффективное количество» означает количество, способное оказывать терапевтическое действие, и оно может быть определено специалистом в данной области обычно используемыми способами. Количества полипептида Омотус, его функционально эквивалентного варианта, конъюгата, слитого белка, полинуклеотида, вектора, клетки или иммуноонкологического средства, которые могут быть объединены в фармацевтических композициях по изобретению, будут варьироваться в зависимости от субъекта и конкретного способа введения. Специалисты в данной области понимают, что дозы также могут быть определены на основании руководств Goodman and Goldman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition (1996), Appendix II, pp. 1707-1711, и Goodman and Goldman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Tenth Edition (2001), Appendix II, pp. 475-493.

Соответствующая доза активного ингредиента, или ингредиентов, в фармацевтической композиции будет зависеть от вида рака, подвергаемого лечению, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли композиции для превентивных

или терапевтических целей, от предыдущей терапии, клинической истории пациента и ответа на пептид или полипептид, а также от решения лечащего врача.

Определенное количество полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентного варианта, слитого белка, конъюгата, полинуклеотида, вектора или клетки соответствующим образом вводят пациенту один раз или в течение ряда процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания соответствующий уровень дозы, как правило, будет составлять примерно 0,01-500 мг на кг массы тела пациента в сутки, его можно вводить в одной или нескольких дозах. Предпочтительно, уровень дозы будет составлять от примерно 0,1 до примерно 250 мг/кг в сутки; более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 100 мг/кг в сутки.

В предпочтительном варианте осуществления количество первого компонента составляет примерно 3,75 мг/кг массы тела субъекта в сутки, предпочтительно вводимое четыре раза в неделю, предпочтительно вводимое интраназально. В предпочтительном варианте осуществления количество первого компонента составляет примерно 8-15 мг/м², предпочтительно 10-12 мг/м², более предпочтительно 11,25 мг/м² в сутки, предпочтительно вводимое четыре раза в неделю, предпочтительно вводимое интраназально.

В предпочтительном варианте осуществления количество первого компонента составляет примерно 50 мг/кг массы тела субъекта в сутки, предпочтительно вводимое два раза в неделю, предпочтительно вводимое внутривенно. В предпочтительном варианте осуществления количество первого компонента составляет примерно 100-200 мг/м², предпочтительно 125-175 мг/м², предпочтительно 140-160 мг/м², более предпочтительно 150 мг/м² в сутки, предпочтительно вводимое два раза в неделю, предпочтительно вводимое внутривенно.

Подходящий уровень дозы может составлять примерно 0,01-250 мг/кг в сутки, примерно 0,05-100 мг/кг в сутки или примерно 0,1-50 мг/кг в сутки. В данном диапазоне доза может составлять 0,05-0,5, 0,5-5 или 5-50 мг/кг в сутки. В случае перорального введения композиции предпочтительно предоставляют в форме таблеток, содержащих 1,0-1000 миллиграмм активного ингредиента, в частности, 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 и 1000,0 миллиграмм активного ингредиента с симптоматической корректировкой дозы для пациента, получающего лечение. Соединения можно вводить в режиме 1-4 раз в сутки, предпочтительно один раз или два раза в сутки.

В одном из вариантов осуществления комбинации или композиции можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю или семь раз в неделю. В одном из вариантов осуществления комбинации или композиции можно вводить один раз в неделю. В другом варианте осуществления комбинации или композиции можно вводить два раза в неделю. В другом варианте осуществления комбинации или композиции можно вводить четыре раза в неделю. В другом предпочтительном варианте осуществления первый компонент

комбинации или композиции вводят четыре раза в неделю, и второй компонент комбинации или композиции вводят один раз в неделю. В другом варианте осуществления первый компонент комбинации или композиции вводят два раза в неделю, и второй компонент комбинации или композиции вводят один раз в неделю. Оба соединения можно вводить одновременно или вводить последовательно. Если соединения вводят последовательно, введение первого соединения прекращают перед началом введения второго соединения.

Продолжительность лечения может составлять по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере две недели, по меньшей мере три недели, по меньшей мере четыре недели, по меньшей мере пять недель, по меньшей мере шесть недель, по меньшей мере семь недель, по меньшей мере восемь недель, по меньшей мере девять недель, по меньшей мере десять недель, или более. Предпочтительно, продолжительность лечения составляет по меньшей мере четыре недели. В другом варианте осуществления продолжительность лечения составляет по меньшей мере три недели.

Количество иммуноонкологического средства зависит от конкретного используемого средства, и может составлять от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг, и предпочтительно от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки, один или более раз в сутки для достижения желаемого терапевтического эффекта. В предпочтительном варианте осуществления количество иммуноонкологического средства составляет примерно 2,5 мг/кг массы тела субъекта в сутки или $7,5 \text{ мг/м}^2$ в сутки, предпочтительно вводимое один раз в неделю, более предпочтительно вводимое парентерально, даже более предпочтительно, внутривенно. В предпочтительном варианте осуществления количество иммуноонкологического средства составляет примерно 5 мг/кг массы тела субъекта в сутки или 15 мг/м^2 в сутки, предпочтительно вводимое один раз в неделю, более предпочтительно вводимое парентерально, даже более предпочтительно, внутривенно. В другом предпочтительном варианте осуществления количество иммуноонкологического средства составляет примерно 10 мг/кг массы тела субъекта в сутки или 30 мг/м^2 в сутки, предпочтительно вводимое один раз в неделю, более предпочтительно вводимое парентерально, даже более предпочтительно, внутривенно.

Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие первый компонент (i), выбранный из полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентного варианта, слитого белка, конъюгата, полинуклеотида, вектора или клетки по изобретению, и второй компонент (ii), который представляет собой иммуноонкологическое средство, могут быть предоставлены в виде одного препарата (например, в виде таблетки или капсулы, содержащей фиксированное количество каждого из компонентов) или, с другой стороны, могут быть предоставлены в виде отдельных препаратов для последующего объединения с целью совместного, последовательного или раздельного введения. Композиции по изобретению также включают препарат в виде комплекта деталей, в котором компоненты сформулированы отдельно, но упакованы в

одном и том же контейнере. Специалисты в данной области понимают, что препараты разных компонентов в фармацевтической композиции по изобретению могут быть аналогичными, иными словами, аналогично сформулированными (в виде таблеток или пилюль), что позволяет вводить их одним и тем же путем введения. В случае, если разные компоненты по изобретению сформулированы отдельно, два компонента могут быть предоставлены в блистерной упаковке. Каждая блистерная упаковка содержит лекарственные средства, которые должны быть приняты в течение суток. Если лекарственные средства должны быть введены несколько раз в сутки, лекарственные средства для каждого введения могут быть помещены в отдельные секции блистерной упаковки, предпочтительно с надписью на каждой секции блистерной упаковки, указывающей время суток, когда они должны быть введены. Альтернативно, компоненты композиции по изобретению могут быть сформулированы по-разному, так, что разные компоненты вводят по-разному. Таким образом, возможно, что первый компонент сформулирован в виде таблетки или капсулы для его перорального введения, и второй компонент сформулирован для его внутривенного введения, или наоборот. Соотношение компонентов, являющихся частью комбинаций или фармацевтических композиций по изобретению, может корректировать квалифицированный специалист в зависимости от противоопухолевого средства, используемого в каждом конкретном случае, а также от соответствующего заболевания. Таким образом, по изобретению предусмотрены композиции, в которых соотношение между количествами компонента (i) и компонента (ii) может находиться в диапазоне от 50:1 до 1:50, в частности, от 20:1 до 1:20, от 1:10 до 10:1 или от 5:1 до 1:5. В более конкретном варианте осуществления соотношение между количествами находится в диапазоне от 1:1 до 1:5, предпочтительно от 1:1 до 1:3. В более предпочтительном варианте осуществления соотношение находится в диапазоне от 1:1 до 1:1,5, предпочтительно от 1:1,3 до 1:1,4, более предпочтительно 1:1,34. В другом предпочтительном варианте осуществления соотношение находится в диапазоне от 1:1 до 1:2,8, предпочтительно от 1:2,6 до 1:2,7, более предпочтительно 1:2,67. В другом конкретном варианте осуществления соотношение между количествами находится в диапазоне от 30:1 до 5:1, предпочтительно от 30:1 до 8:1, более предпочтительно от 25:1 до 15:1, более предпочтительно от 20:1 до 10:1. В одном из вариантов осуществления соотношение составляет 20:1. В другом варианте осуществления соотношение составляет 10:1. Предпочтительно, эти соотношения представляют собой соотношения по массе.

Компоненты фармацевтической композиции или комбинации по изобретению можно вводить одновременно. «Одновременное введение» означает совместное введение двух лекарственных средств, независимо от относительной частоты или времени введения соответствующих средств. Таким образом, одновременное введение означает совместное введение двух лекарственных средств в одно и то же время и с одинаковой частотой введения. Кроме того, одновременное введение означает совместное введение двух лекарственных средств, при котором одно средство вводят чаще, чем другое(ие). Кроме того, одновременное введение означает совместное введение двух лекарственных средств,

при котором одно средство вводят только один раз в течение периода введения другого средства(средств).

В одном из вариантов осуществления компонент (i) вводят интраназально. В другом варианте осуществления компонент (i) вводят внутривенно. В другом варианте осуществления компонент (ii) вводят парентерально, в частности, внутривентриально.

В предпочтительном варианте осуществления компонент (i) комбинации или фармацевтической композиции по изобретению вводят интраназально, при этом иммуноонкологическое средство вводят парентерально, в частности, внутривентриально или внутривенно. В случае интраназального введения предпочтительная доза компонента (i) комбинации или композиции по изобретению, предпочтительно, предпочтительная доза полипептида или его функционально эквивалентного варианта, слитого белка или конъюгата находится в диапазоне от 0,01 до 250 мг/кг, которая может быть введена в одной или нескольких дозах, более предпочтительно от 0,1 до примерно 100 мг/кг в сутки. Предпочтительная доза иммуноонкологического средства в случае внутривентриального введения составляет от 0,01 до 150 мг/кг, более предпочтительно от 0,1 до 100 мг/кг.

В другом варианте осуществления компонент (i) комбинации или фармацевтической композиции по изобретению вводят внутривенно, при этом иммуноонкологическое средство вводят парентерально, в частности, внутривентриально или внутривенно.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может содержать одно или более дополнительных соединений для предотвращения и/или лечения патологий, при которых имеет место неконтролируемое деление клеток, например, рака. Указанные дополнительные соединения, такие как противоопухолевые средства, могут являться частью фармацевтической композиции в виде независимых компонентов. В предпочтительном варианте осуществления комбинации или фармацевтические композиции по изобретению содержат одно или более противоопухолевых средств, выбранных из группы, состоящей из цитотоксического средства, антиангиогенного средства, антиметастатического средства и антипролиферативного средства.

Фармацевтическая композиция по изобретению также содержит один или более дополнительных фармацевтически приемлемых эксципиентов. «Фармацевтически приемлемый эксципиент» означает терапевтически неактивное вещество, используемое для включения активного ингредиента, и приемлемое для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения, и для химика-фармацевта, изготавливающего его, с физической/химической точки зрения в отношении композиции, препарата, стабильности, приемлемости для пациента и биодоступности. Эксципиент может представлять собой носитель. Используемый в настоящем документе термин «носитель» должен означать любое вещество, способствующее улучшению доставки и эффективности активного ингредиента в фармацевтической композиции. В предпочтительном варианте осуществления носитель не позволяет непосредственно доставлять компонент (i) и/или (ii) в цитоплазму клеток, то есть, носитель не способен к

слиянию с плазматической мембраной клеток-мишеней. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и тому подобного, а также их сочетания. Во многих случаях было бы предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в комбинацию или композицию. Фармацевтически приемлемые носители могут также содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности при хранении или эффективность компонентов, являющихся частью комбинаций или композиций по изобретению. Примеры надлежащих носителей хорошо известны из литературы (смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Примеры носителей включают, без ограничения, серию сахаридов, таких как лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, ксилит, эритрит и мальтит; серию крахмалов, таких как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал; серию целлюлоз, таких как целлюлоза, метилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза и гидроксилпропилметилцеллюлоза; и серию наполнителей, таких как желатин и поливинилпирролидон. В некоторых случаях могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или альгинат натрия.

Количество и природа фармацевтически приемлемых эксципиентов зависят от желательной лекарственной формы. Фармацевтически приемлемые эксципиенты известны специалистам в данной области (Faulí y Trillo C. (1993) «Tratado de Farmacia Galénica», Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Указанные композиции могут быть получены общепринятыми способами, известными в данной области («Remington: The Science and Practice of Pharmacy», 20th edition (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, US).

В случае фармацевтических композиций, содержащих средство, которое представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать в любой из различных систем доставки, известных специалистам в данной области, включая нуклеиновую кислоту, а также бактериальные, вирусные системы экспрессии и системы экспрессии в клетках млекопитающих, такие как, например, рекомбинантные экспрессионные конструкции, предложенные в настоящем документе. Методы включения ДНК в такие экспрессионные системы хорошо известны специалистам в данной области. ДНК также может быть «голой», как описано, например, в публикации Ulmer et al., Science 259:1745-49, 1993 и в обзоре Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. Поглощение «голой» ДНК можно увеличивать за счет нанесения ДНК на биоразлагаемые гранулы, которые эффективно переносятся в клетки.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены в клетку любым из нескольких способов, описанных в данной области (смотри, например, Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed.

Akhtar, 1995, Maurer et al., *Mol. Membr. Biol.* 16:129-40 (1999); Hofland and Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165-92 (1999); Lee et al., *ACS Symp. Ser.* 752:184-92 (2000); патент США № 6395713; публикацию международной патентной заявки № WO 94/02595); Selbo et al., *Int. J. Cancer* 87:853-59 (2000); Selbo et al., *Tumour Biol.* 23:103-12 (2002); публикации патентных заявок США №№ 2001/0007666 и 2003/077829). Такие способы доставки, известные специалистам в данной области, включают, но не ограничиваются ими, инкапсуляцию в липосомы, путем ионтофореза или путем включения в другие носители, такие как биоразлагаемые полимеры; гидрогели; циклодекстрины (смотри, например, Gonzalez et al., *Bioconjug. Chem.* 10: 1068-74 (1999); Wang et al., публикации международных патентных заявок №№ WO 03/47518 и WO 03/46185); микросферы из поли(молочной-со-гликолевой) кислоты (PLGA) и PLCA (также полезны для доставки пептидов, полипептидов и других веществ) (смотри, например, патент США № 6447796; публикацию патентной заявки США № 2002/130430); биоразлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, или при помощи белковых векторов (публикация международной патентной заявки № WO 00/53722). В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты могут также быть сформулированы, или находиться в комплексе, с полиэтиленимином и его производными, такими как полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-N-ацетилгалактозамин (PEI-PEG-GAL) или полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-три-N-ацетилгалактозамин (PEI-PEG-triGAL) (смотри также, например, публикацию патентной заявки США № 2003/0077829).

В конкретном варианте осуществления, если соединение по изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, фармацевтическая композиция может быть сформулирована в виде композиции, предназначенной для применения в генной терапии; в качестве иллюстрации, но не ограничения, такая фармацевтическая композиция может содержать вирусный или невирусный вектор, который содержит соответствующий полинуклеотид или генную конструкцию. В качестве иллюстрации, но не ограничения, указанные векторы могут быть вирусными, например, на основе ретровируса, аденовируса и так далее, или невирусными, такими как ADN-липосома, ADN-полимер, комплексы ADN-полимер-липосома и так далее [смотри «Nonviral Vectors for Gene Therapy», под редакцией Huang, Hung and Wagner, Academic Press (1999)]. Указанные векторы, содержащие соответствующий полинуклеотид или генную конструкцию, могут быть введены непосредственно субъекту общепринятыми способами. Альтернативно, указанные векторы могут быть использованы для трансформирования или трансфицирования, или инфицирования клеток, например, клеток млекопитающих, включая человеческие, *ex vivo*, которые впоследствии будут имплантированы в тело человека или животного для достижения желаемого терапевтического эффекта. Для введения в тело человека или животного указанные клетки будут сформулированы в соответствующей среде, которая не будет оказывать негативное влияние на жизнеспособность клеток.

Комбинацию или фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить

любым подходящим путем введения, например, пероральным путем, топическим путем, ингаляцией или парентеральным путем, так что будут включены фармацевтически приемлемые эксципиенты, необходимые для формулирования нужной лекарственной формы. Другие пути введения могут представлять собой ректальный, интрацестеральный или интравлагинальный пути введения. Предпочтительным путем введения указанной комбинации или фармацевтической композиции является эндовенозный путь введения.

«Пероральный путь» введения означает, что фармацевтическая композиция поступает в организм после проглатывания. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может находиться в лекарственной форме, подходящей для ее введения пероральным путем, либо в твердой, либо в жидкой форме. Лекарственные формы, подходящие для их введения пероральным путем, могут представлять собой таблетки, капсулы, сиропы или растворы, и могут содержать любые общепринятые эксципиенты, известные в данной области, такие как связывающие вещества, например, сироп, гуммиарабик, желатин, сорбит или поливинилпирролидон; наполнители, например, лактозу, сахар, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; смазывающие средства для прессования, например, стеарат магния; разрыхлители, например, крахмал, поливинилпирролидон, натрия крахмала гликолят или микрокристаллическую целлюлозу; или фармацевтически приемлемые увлажняющие средства, такие как лаурилсульфат натрия. Твердые пероральные композиции могут быть получены общепринятыми способами смешивания, наполнения или прессования. Повторяющиеся операции смешивания могут быть использованы для полного распределения активного ингредиента в тех композициях, в которых используют большое количество наполнителей. Такие операции являются общепринятыми в данной области. Таблетки могут быть получены, например, путем влажной или сухой грануляции и, необязательно, покрытия их способами, известными в обычной фармацевтической практике, в частности, путем нанесения энтеросолюбильного покрытия.

С другой стороны, «топический путь» введения означает введение не системным путем и включает нанесение фармацевтической композиции по изобретению наружно на эпидермис, в ротовую полость, а также инстилляцию указанной композиции в уши, глаза и нос, и при этом она незначительно попадает в кровоток. Лекарственные формы для топического или чрескожного введения соединения по настоящему изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, аэрозоли или пластыри.

Офтальмологические препараты, ушные капли и глазные капли также входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, по настоящему изобретению предусмотрено использование чрескожных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество за счет обеспечения контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования соединения в соответствующей среде. Можно также использовать усилители поглощения для

увеличения потока соединения через кожу. Скорость можно контролировать либо за счет использования контролирующей скорость мембраны, либо за счет диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

В одном из вариантов осуществления комбинацию или фармацевтическую композицию вводят системно.

«Системный путь» введения означает введение пероральным путем, внутривенным путем, внутрибрюшинным путем и внутримышечным путем. Количество компонентов (i) и (ii), необходимое для достижения терапевтического или профилактического эффекта, естественно, будет варьироваться в зависимости от выбранного соединения, природы и степени тяжести заболевания, подвергаемого лечению, и от пациента.

В другом варианте осуществления комбинацию или фармацевтическую композицию вводят интраназально. В предпочтительном варианте осуществления интраназальное введение выполняют путем инстилляций или назальной ингаляции.

«Ингаляция» означает введение интраназальным путем и путем пероральной ингаляции. Лекарственные формы, подходящие для указанного пути введения, например, препарат в аэрозольном или дозирующем ингаляторе, могут быть получены общепринятыми методами. В одном из вариантов осуществления путь введения представляет собой интраназальный путь введения.

Используемый в настоящем документе термин «парентеральный путь» введения охватывает введение внутривенным путем, внутрибрюшинным путем, внутримышечным путем или подкожным путем. Подкожные, внутримышечные и внутривенные лекарственные формы для парентерального введения, как правило, являются предпочтительными.

В одном варианте осуществления комбинации или фармацевтические композиции по изобретению могут быть адаптированы для их парентерального введения, например, представлять собой стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в соответствующей стандартной лекарственной форме. Комбинации или фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (когда они растворимы в воде), либо дисперсии и стерильные порошки для приготовления из них стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. В случае их введения внутривенным путем некоторые подходящие носители включают фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях комбинация или композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить инъекцией. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель, или дисперсионную среду, представляющую собой, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и их соответствующие смеси. Можно поддерживать подходящую текучесть, например, за счет использования покрытия, такого

как лецитин, за счет поддержания размера частиц, необходимого в случае дисперсии, и за счет использования сурфактантов. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать путем использования различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и тому подобного. В большинстве случаев предпочтительнее будет включать в композицию изотонические средства, например, сахара; полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечивать путем включения средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Инъекционные стерильные растворы могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним из, или сочетанием, вышеупомянутых ингредиентов, по мере необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрования через стерильные мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный растворитель, содержащий основную дисперсионную среду и остальные необходимые ингредиенты из числа перечисленных ранее. В случае стерильных порошков для получения инъекционных стерильных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, результатом чего является порошок с активным ингредиентом плюс любой желательный дополнительный ингредиент из его ранее профильтрованного стерильного раствора.

Комбинации или фармацевтические композиции по изобретению можно соответствующим образом вводить путем импульсной инфузии, например, с уменьшением доз композиции. Предпочтительно, дозу вводят путем инъекций, более предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение неотложным или постоянным. В предпочтительном варианте осуществления антагонист PD-1 вводят путем инфузии.

Альтернативно, как упомянуто выше, разные компоненты композиции вводят по-разному.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления компонент (i) комбинации или композиции, предпочтительно полипептид или функционально эквивалентный вариант, или конъюгат по изобретению, вводят интраназально, при этом иммуноонкологическое средство вводят системно.

В другом предпочтительном варианте осуществления компонент (i) комбинации или композиции, предпочтительно полипептид или его функционально эквивалентный вариант, или конъюгат композиции, вводят интраназально или путем ингаляции.

Лекарственные формы композиций, предназначенные для интраназального и внутрилегочного введения, предпочтительно представляют собой жидкость, суспензию или твердое вещество. Суспензия представляет собой жидкий препарат, содержащий твердые частицы, диспергированные в жидкой среде. Лекарственные формы предпочтительно являются дозированными. Например, дозированные капли/спреи

означают, что раздаточное устройство, заключающее в себе капли/спреи, доставляет капли/спреи, содержащие отмеренную дозу (заранее определенное количество) композиции, используемой по изобретению.

Одна предпочтительная лекарственная форма в контексте интраназального пути введения включает назальные капли. Капли оседают в основном в задней части носа и, таким образом, быстро поступают в носоглотку. При использовании капель часто возникает проблема точного контроля дозы лекарственного средства, что особенно важно при введении композиции.

Другой интраназальной лекарственной формой, с помощью которой можно вводить фармацевтическую композицию по изобретению, являются назальные спреи. Назальные спреи обычно содержат конъюгат, растворенный или суспендированный в растворе или смеси эксципиентов (например, консервантов, модификаторов вязкости, эмульгаторов, буферных средств), в дозаторе под атмосферном давлением. Назальные спреи имеют ряд преимуществ, включая компактность устройства доставки, удобство, простоту использования и точность доставки доз от 25 до 200 пл. Дозы оседают в передней части носа и медленно выводятся в носоглотку за счет мукоцилиарного клиренса. Назальный спрей, описанный в настоящем документе, может представлять собой жидкость или суспензию.

Другой интраназальной лекарственной формой является назальный аэрозоль. Назальные аэрозоли отличаются от назальных спреев методом дозирования конъюгата: в аэрозолях соединение дозируется за счет избыточного давления и выпускается через клапан. В спреях соединение дозируется за счет вытеснения микронасосом, в то время как давление во флаконе аналогично атмосферному. Аэрозоли имеют те же преимущества, что и спреи.

Альтернативно, композицию по изобретению можно предпочтительно вводить в виде назальных эмульсий, мазей, гелей, паст или кремов. Они представляют собой высоковязкие растворы или суспензии, наносимые на слизистую оболочку носа.

Вследствие ограниченного объема композиции, который может быть эффективно доставлен на слизистую оболочку носа, жидкие интраназальные лекарственные формы, как правило, имеют более высокие концентрации, чем соответствующие внутривенные лекарственные формы. Когда вещества становятся плохо растворимыми или нестабильными в жидкой форме, для введения композиции по изобретению можно использовать порошки. Дополнительные преимущества порошков заключаются в том, что они не требуют консервантов и, как правило, обладают более высокой стабильностью в сравнении с жидкими препаратами. Основное ограничение для интраназального применения порошка связано с его раздражающим действием на слизистую оболочку носа.

Одной из лекарственных форм в контексте внутрилегочного введения является ингаляционный аэрозоль. Аэрозоли для ингаляций, как правило, упакованы под давлением и содержат композицию, используемую по изобретению, которая

высвобождается при активации клапанной системы в дыхательные пути, в частности, в легкие. Выпущенный аэрозоль представляет собой коллоид мелких твердых частиц (суспензия) или капель жидкости (раствор) в воздухе или другом газе. Соответственно, аэрозоль может представлять собой аэрозоль раствора или суспензии. Капли жидкости или твердые частицы предпочтительно имеют диаметр менее 100 мкм, более предпочтительно менее 10 мкм, наиболее предпочтительно менее 1 мкм.

Другой лекарственной формой в контексте внутрилегочного введения являются ингаляционные спреи. Ингаляционные спреи, как правило, имеют водную основу и не содержат пропеллент. Они доставляют конъюгат в легкие путем пероральной ингаляции.

Для доставки конъюгата внутрилегочным путем можно также использовать небулизированные ингаляционные растворы и суспензии. Небулизированные ингаляционные растворы и суспензии, как правило, представляют собой препараты на водной основе, содержащие композицию по изобретению. Небулизированные ингаляционные растворы и суспензии доставляют композицию в легкие путем пероральной ингаляции для системного воздействия и используются при помощи небулайзера.

Ингаляция сухого порошка является альтернативой аэрозольной ингаляции. Композиция, как правило, заключена в капсуле для ручной загрузки или в ингаляторе. Сухие порошки, как правило, доставляются ингалятором в легкие путем пероральной ингаляции. Сухие порошки, используемые по настоящему изобретению, могут быть сформулированы в чистом виде. Чистые препараты содержат исключительно, или почти исключительно, лекарственное средство, например, в виде высушенного порошка. Сухие порошки, используемые по настоящему изобретению, также могут быть сформулированы с носителем, таким как лактоза.

Внутрилегочные лекарственные формы предпочтительно являются дозированными, то есть, доставляются в легкие в заранее определенном количестве.

Устройства для интраназальной доставки в контексте настоящего изобретения включают системы распылительных насосов, пипетки для подачи капель, дозированные распылительные насосы, назальные аэрозольные дозированные ингаляторы, системы распыления порошка, активируемые вдохом порошковые ингаляторы и назальные порошковые инсуффляторы. Устройство для интраназальной доставки может быть заполнено количеством, соответствующим одной дозе или множеству доз интраназального препарата.

При внутрилегочном способе введения конъюгат можно вводить с помощью дозированного ингалятора. Дозированный ингалятор (MDI) обеспечивает образование мелкой дисперсии конъюгата, как правило, с аэродинамическим размером частиц менее 5 мкм.

Альтернативно, для внутрилегочной доставки композиции можно использовать ингаляторы сухого порошка. Ингаляторы сухого порошка содержат порошки в количестве одной дозы или множества доз.

Другим устройством для внутрилегочной доставки является небулайзер, включая ультразвуковые и воздушно-струйные небулайзеры. В ультразвуковых небулайзерах ультразвуковые волны создаются в камере ультразвукового распылителя керамическим пьезоэлектрическим кристаллом, который вибрирует при электрическом возбуждении. В результате на поверхности раствора образуется облако аэрозоля. Аэрозоль, создаваемый воздушно-струйным небулайзером, образуется при прохождении сжатого воздуха через отверстие. Жидкость может выводиться из перпендикулярного сопла (эффект Бернулли), смешиваясь с воздушной струей, которая распыляется с помощью перегородок для облегчения образования облака аэрозоля.

В одном варианте осуществления каждый из компонентов комбинации или фармацевтической композиции по изобретению готовят с носителями, которые будут защищать компоненты, особенно компонент (i), от быстрого выведения из организма, примером является препарат с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы введения. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения указанных препаратов известны специалистам в данной области. Материалы могут быть приобретены у компаний Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc.

Композиции с замедленным высвобождением также включают препараты кристаллов, суспендированных в соответствующих препаратах, поддерживающих кристаллы в суспензии. Эти препараты при инъекции подкожным или внутрибрюшинным путем могут производить эффект замедленного высвобождения. Другие композиции также содержат компоненты (i) и/или (ii), заключенные в липосомы. Липосомы, содержащие такие компоненты, получают известными способами, например, описанными в публикациях Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949. В предпочтительном варианте осуществления компоненты (i) и/или (ii) содержатся в липосомах, предпочтительно оба компонента содержатся в липосомах, более предпочтительно в одной и той же липосоме.

Несмотря на то, что Ототус, его функционально эквивалентные варианты, конъюгаты и слитые белки по изобретению способны перемещаться через биологические мембраны, можно формулировать Ототус, любой из его функционально эквивалентных вариантов, конъюгаты, полинуклеотиды, векторы или клетки в наночастицах. Наночастицы могут способствовать сохранению целостности компонентов в биологических жидкостях до достижения ими органа-мишени. Кроме того, в случае композиций, содержащих компонент (ii) или другое противоопухолевое средство, инкапсуляция композиции может уменьшать вторичные эффекты, вызываемые противоопухолевым средством. Кроме того, наночастицы также могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать фрагменты, позволяющие нацеливать наночастицу на интересующий орган. В этом случае компонент (i) комбинации или

композиции по изобретению будет доставлен в непосредственную близость от органа-мишени, что облегчает доступ компонента (i) внутрь клеток, где необходима его биологическая активность.

Таким образом, в другом варианте осуществления предоставлен компонент (i) комбинации или композиции по изобретению, являющийся частью наночастицы. В другом варианте осуществления предоставлены оба компонента комбинации или композиции по изобретению, являющиеся частью наночастицы, предпочтительно оба компонента предоставлены в одной и той же наночастице.

Используемый в настоящем документе термин «наночастица» относится к любому материалу, имеющему размеры в диапазоне 1-1000 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют размеры в диапазоне 2-200 нм, предпочтительно в диапазоне 2-150 нм, и даже более предпочтительно в диапазоне 2-100 нм. Наночастицы, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают такие наноразмерные материалы, как наночастица на основе липида, суперпарамагнитная наночастица, нанооболочка, полупроводниковый нанокристалл, квантовая точка, полимерная наночастица, силиконовая наночастица, кремнеземная наночастица, металлическая наночастица, фуллерен и нанотрубка. Молекулы могут быть либо погружены в матрицу наночастицы, либо могут быть адсорбированы на ее поверхности, предпочтительно молекулы погружены в наночастицу.

В предпочтительном варианте осуществления наночастица представляет собой липосому.

Направленная доставка может быть достигнута за счет добавления лигандов, без ущерба для способности наночастиц доставлять их содержимое. Предусмотрено, что это позволит осуществлять доставку к конкретным клеткам, тканям и органам. Специфичность направленности систем доставки на основе лигандов основана на распространенности рецепторов лигандов на клетках разных типов. Направляющий лиганд может быть либо не ковалентно, либо ковалентно, связан с наночастицей, и может быть конъюгирован с наночастицами различными способами, описанными в настоящем документе.

Примеры белков или пептидов, которые могут быть использованы для нацеливания наночастиц, включают трансферин, лактоферрин, TGF- β , фактор роста нервов, альбумин, пептид Tat HIV, пептид RGD и инсулин, а также другие.

Следует понимать, что препараты по изобретению в наночастице предназначены не для, или предназначены не только для, облегчения доступа компонентам (i) и/или (ii) внутрь клетки, а для защиты компонентов (i) и/или (ii) от деградации и/или для облегчения нацеливания наночастицы на интересующий орган.

В одном примере наночастица может быть выполнена из биоразлагаемого полимера, такого как поли(бутилцианоакрилат) (PBCA). Примеры элементарных наночастиц включают наночастицы углерода и наночастицы оксида железа, которые затем могут быть покрыты олеиновой кислотой (ОА)-плюронином (Р). При таком подходе

лекарственное средство (например, гидрофобное или нерастворимое в воде лекарственное средство) загружается в наночастицу. Другие наночастицы выполнены из кремнезема.

Наночастицы могут быть получены из любого полезного полимера. Примеры полимеров включают биоразлагаемые полимеры, такие как поли(бутилцианоакрилат), поли(лактид), поли(гликолид), поли- ϵ -капролактон, поли(бутиленсукцинат), поли(этиленсукцинат) и поли(п-диоксанон); поли(этиленгликоль); поли-2-гидроксиэтилметакрилат (поли(НЭМА)); сополимеры, такие как поли(лактид-со-гликолид), поли(лактид)-поли(этиленгликоль), поли(поли(этиленгликоль)цианоакрилат-когексадецилцианоакрилат и поли [НЭМА-со-метакриловая кислота]; белки, такие как фибриноген, коллаген, желатин и эластин; а также полисахариды, такие как амилопектин, амилоза и хитозан.

Другие наночастицы включают твердые липидные наночастицы (SLN). Примеры молекул липидов для твердых липидных наночастиц включают стеариновую кислоту и модифицированную стеариновую кислоту, такую как стеариновая кислота-ПЭГ 2000; соевый лецитин и эмульгированный воск. Твердые липидные наночастицы могут, необязательно, включать другие компоненты, в том числе сурфактанты, такие как эпикурон(R) 200, полоксамер 188 (плюроник(R) F68), бридж 72, бридж 78, полисорбат 80 (твин 80); и соли, такие как таурохолат натрия. Средства можно вводить в твердые липидные наночастицы с помощью ряда способов, описанных для липосом, где такие способы могут дополнительно включать гомогенизацию под высоким давлением и диспергирование микроэмульсий.

Наночастицы также могут включать мицеллы нанометрового размера. Мицеллы могут быть получены из любых полимеров, описанных в настоящем документе. Примеры полимеров для получения мицелл включают блок-сополимеры, такие как поли(этиленгликоль) и поли(ϵ -капролактон), (например, блок-сополимер PEO-b-PCL, включающий полимер ϵ -капролактона и α -метокси- ω -гидроксиполи(этиленгликоля)).

В конкретных вариантах осуществления свойства наночастиц изменяют за счет покрытия сурфактантом. Можно использовать любой биосовместимый сурфактант, например, полисорбатные сурфактанты, такие как полисорбат 20, 40, 60 и 80 (твин 80); эпикурон(R) 200; полоксамерные сурфактанты, такие как 188 (плюроник(R) F68) полоксамер 908 и 1508; и сурфактанты бридж, такие как бридж 72 и бридж 78.

Наночастицы можно, необязательно, модифицировать для включения гидрофильных полимерных групп (например, поли(этиленгликоля) или поли(пропиленгликоля)), например, путем ковалентного присоединения гидрофильных полимерных групп к поверхности или путем использования полимеров, содержащих такие гидрофильные полимерные группы (например, поли[метоксиполи(этиленгликоль)-цианоакрилат-со-гексадецилцианоакрилата]). Наночастицы могут быть, необязательно, сшиты, что может быть особенно полезно для наночастиц на основе белка.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению представляет собой наноэмульсию. Используемый в настоящем документе термин

«наноэмульсия» означает коллоидную дисперсию капель (или частиц), в которой по меньшей мере некоторые из капель имеют диаметры в нанометровом диапазоне размеров. Наноэмульсии состоят из масел, богатых жирными кислотами омега-3, -6 или -9, в водной фазе и термодинамически стабилизированных амфифильными сурфактантами, которые образуют на межфазной поверхности мембрану, полученную с использованием процесса микрофлюидизации с высоким сдвигом, обычно с диаметром капель в диапазоне примерно 80-220 нм.

Варианты терапевтического применения по изобретению

В одном из аспектов изобретение относится к комбинации или фармацевтической композиции по изобретению для применения в медицине.

В следующем аспекте изобретение относится к комбинации или фармацевтической композиции по изобретению для применения в предотвращении и/или лечении рака.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации или фармацевтической композиции по изобретению для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для предотвращения и/или лечения рака.

В другом аспекте изобретение также относится к способу предотвращения и/или лечения рака, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества комбинации или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом аспекте изобретение также относится к способу предотвращения и/или лечения рака путем рекрутинга Т-клеток к зоне опухоли, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества комбинации или фармацевтической композиции по изобретению. В одном из вариантов осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой активированные CD4 Т-клетки, более конкретно, представляют собой CD4⁺PD-1⁺ Т-клетки, даже более конкретно, представляют собой CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ Т-клетки. В другом варианте осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ Т-клетки. В другом варианте осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой CD8 Т-клетки, более конкретно, представляют собой CD8⁺PD-1⁺ Т-клетки. В другом варианте осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой CD3⁺ Т-клетки. В другом варианте осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой CD3⁺CD4⁺ Т-клетки. В другом варианте осуществления Т-клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой Th1/Th17 клетки, в частности, Th1/Th17 PD-1⁺ клетки, более конкретно, CD4⁺ IFN⁺IL-17⁺ Т-клетки, даже более конкретно, CD4⁺PD-1⁺IFN⁺IL-17⁺ Т-клетки. В другом варианте осуществления клетки, рекрутированные к зоне опухоли, представляют собой CD45⁺ клетки.

В другом аспекте изобретение также относится к способу предотвращения и/или лечения рака путем индукции размножения регуляторных Т-клеток, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества

комбинации или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом аспекте изобретение также относится к способу предотвращения и/или лечения рака путем индукции продуцирования IFN-гамма внутриопухолевыми CD4+ и CD8+ клетками, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества комбинации или фармацевтической композиции по изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления превентивный или терапевтический способ по изобретению включает непосредственное использование комбинации или композиции, содержащей полипептид, представляющий собой Омотус, его функционально эквивалентный вариант, конъюгат или слитый белок. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления превентивные или терапевтические способы по изобретению не включают введение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, представляющий собой Омотус или его функционально эквивалентный вариант, или слитый белок, или введение вектора, кодирующего эту нуклеиновую кислоту, или клетки, содержащей указанную нуклеиновую кислоту.

«Предотвращение» означает введение комбинации или композиции по изобретению на начальной или ранней стадии заболевания, или также для предотвращения начала его развития.

Термин «лечение» означает введение комбинации или композиции по изобретению для контроля прогрессирования заболевания до или после появления клинических признаков. Контроль прогрессирования заболевания понимают как благоприятные или желаемые клинические результаты, которые включают, но без ограничения, уменьшение симптомов, сокращение продолжительности заболевания, стабилизацию патологического состояния (в частности, предотвращение дополнительного ухудшения), задержку прогрессирования заболевания, улучшение патологического состояния и ремиссию (как частичную, так и полную). Контроль прогрессирования заболевания также подразумевает продление срока выживания в сравнении с ожидаемым сроком выживания без применения лечения. В предпочтительном варианте осуществления контроль прогрессирования заболевания определяют на основании отношения объема здоровых легких к объему грудной клетки. В другом варианте осуществления контроль прогрессирования заболевания определяют на основании уменьшения объема опухоли.

Термин «рак» означает заболевание, характеризующееся неконтролируемым делением клеток (или увеличением их выживаемости, или устойчивостью к апоптозу), способностью указанных клеток к вторжению в другие соседние ткани (инвазия) или к распространению в другие области тела, где эти клетки обычно отсутствуют (метастазирование), через лимфатические и кровеносные сосуды. В зависимости от того, могут ли опухоли распространяться путем инвазии и метастазирования, их классифицируют как доброкачественные или злокачественные: доброкачественные опухоли представляют собой опухоли, которые не способны распространяться путем инвазии или метастазирования, то есть, они лишь медленно растут; в то время как

злокачественные опухоли представляют собой опухоли, которые способны распространяться путем инвазии и метастазирования. Способы по настоящему изобретению полезны для лечения локализованных и злокачественных опухолей.

В одном варианте осуществления рак включает, без ограничения, лейкозы (например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз), волосатоклеточный лейкоз, истинную полицитемию, лимфому (например, болезнь Ходжкина или неходжкинскую лимфому), связанные со СПИДом лейкозы, макроглобулинемию Вальденстрема, множественную миелому, болезнь тяжелых цепей, и солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, менингиомахосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, саркому Капоши, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак желчевыводящих путей, рак пищевода, рак яичников, рак предстательной железы, рак полости рта, включая плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, тератому, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак тела матки, рак яичек, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, интраэпителиальные новообразования, включая болезнь Боуэна и болезнь Педжета, нейроглиому, глиому, астроцитому, мультиформную глиобластому (МФГ, также известную как глиобластома), медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, шванному, нейрофибросаркому, менингиому, меланому, нейробластому и ретинобластому).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому, астроцитому, мультиформную глиобластому (МФГ, также известную как глиобластома), медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, шванному, нейрофибросаркому, менингиому, меланому, нейробластому или ретинобластому.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой невриному слухового нерва, астроцитому (например, категории I - пилоцитарную астроцитому, категории II - астроцитому низкой степени, категории III - анапластическую астроцитому или категории IV - глиобластому (МФГ)), хордому, лимфому ЦНС, краниофарингиому, глиому ствола головного мозга, эпендимому, смешанную глиому, глиому зрительного

нерва, субэпендимому, медуллобластоме, менингиоме, метастатическую опухоль головного мозга, олигодендроглиому, опухоли гипофиза, примитивную нейроэктодермальную (ПНЭО) опухоль или шванному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой тип, чаще встречающийся у детей, чем у взрослых, такой как глиома ствола головного мозга, краниофарингиома, эпендимома, ювенильная пилоцитарная астроцитома (ЮПА), медуллобластома, глиома зрительного нерва, опухоль шишковидной железы, примитивные нейроэктодермальные опухоли (ПНЭО) или рабдоидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления пациент является взрослым человеком. В некоторых вариантах осуществления пациент является ребенком или педиатрическим пациентом.

В другом варианте осуществления рак включает, без ограничения, мезотелиому, гепатобилиарный рак (печени и желчных протоков), рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта (желудка, ободочной и прямой кишки, и двенадцатиперстной кишки), рак матки, карциному фаллопиевой трубы, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, рак яичек, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, неходжкинскую лимфому, опухоли спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, рак коры надпочечников, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому, или сочетание одного или более из вышеперечисленных видов рака.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной карциномы, рака яичников, рака эпителия яичников или рака фаллопиевой трубы; папиллярной серозной цистаденокарциномы или серозной папиллярной карциномы матки (СПКМ); рака предстательной железы; рака яичек; рака желчного пузыря; гепатохолангиокарциномы; синовиальной саркомы мягких тканей и костей; рабдомиосаркомы; остеосаркомы; хондросаркомы; саркомы Юинга; анапластического рака щитовидной железы; аденомы коры надпочечников; рака поджелудочной железы; протоковой карциномы поджелудочной железы или аденокарциномы поджелудочной железы; рака желудочно-кишечного тракта/желудка (РЖКТ); лимфомы; плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ); рака слюнных желез; глиомы или рака головного мозга; связанных с нейрофиброматозом I типа злокачественных опухолей оболочки периферических нервов (ЗООПН); макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной

карциномы (ГЦК), гепатобластомы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака яичников, рака эпителия яичников, рака фаллопиевой трубы, папиллярной серозной цистаденокарциномы, папиллярной серозной карциномы матки (СПКМ), гепатохолангиокарциномы, синовиальной саркомы мягких тканей и костей, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, анапластического рака щитовидной железы, аденомы коры надпочечников, рака поджелудочной железы, протоковой карциномы поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, глиомы, связанных с нейрофиброматозом 1 типа злокачественных опухолей оболочки периферических нервов (ЗООПН); макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, такую как саркома, карцинома или лимфома. Солоидные опухоли обычно представляют собой аномальную массу ткани, которая, как правило, не включает кисты или жидкие участки. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из почечно-клеточной карциномы или рака почки; гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) или гепатобластомы, или рака печени; меланомы; рака молочной железы; колоректальной карциномы или колоректального рака; рака толстой кишки; рака прямой кишки; анального рака; рака легких, такого как немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) или мелкоклеточный рак легких (МРЛ); рака яичников, эпителиального рака яичников, карциномы яичников или рака фаллопиевой трубы; папиллярной серозной цистаденокарциномы или папиллярной серозной карциномы матки (СПКМ); рака предстательной железы; рака яичек; рака желчного пузыря; гепатохолангиокарциномы; синовиальной саркомы мягких тканей и костей; рабдомиосаркомы; остеосаркомы; хондросаркомы; саркомы Юинга; анапластического рака щитовидной железы; карциномы коры надпочечников; рака поджелудочной железы; рака протоков поджелудочной железы или аденокарциномы поджелудочной железы; рака желудочно-кишечного тракта/желудка (РЖКТ); лимфомы; плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ); рака слюнных желез; глиомы или рака головного мозга; связанных с нейрофиброматозом 1 типа злокачественных опухолей оболочки периферических нервов (ЗООПН); макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), гепатобластомы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака яичников, рака эпителия яичников, карциномы яичников, рака фаллопиевой трубы, папиллярной серозной цистаденокарциномы, папиллярной серозной карциномы матки (СПКМ), гепатохолангиокарциномы, синовиальной саркомы мягких тканей и костей, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, анапластического рака щитовидной железы, адренокортикальной карциномы, рака поджелудочной железы, рака протоков поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, глиомы, связанных с нейрофиброматозом 1 типа злокачественных опухолей оболочки периферических нервов (ЗООПН); макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой печеночно-

клеточную карциному (ГЦК). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатобластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак прямой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника, или карциному яичника. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой эпителиальный рак яичников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак фаллопиевой трубы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой папиллярную серозную цистаденокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой серозную папиллярную карциному матки (СПКМ). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатохолангиокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой синовиальную саркому мягких тканей и костей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рабдомиосаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой остеосаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой анапластический рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой карциному коры надпочечников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы или протоковую карциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой аденокарциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой злокачественные опухоли оболочки периферических нервов (ЗООПН). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой связанные с нейрофиброматозом 1 типа ЗООПН. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой медуллобластому.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, ассоциированный с вирусом, включая солидные опухоли, ассоциированные с вирусом иммунодефицита человека (HIV), положительные по вирусу папилломы человека (HPV)-16 неизлечимые солидные опухоли и Т-клеточный лейкоз у взрослых, вызываемый человеческим вирусом Т-клеточного лейкоза I типа (HTLV-I) и являющийся высокоагрессивной формой CD4+ Т-клеточного лейкоза, характеризующейся клональной интеграцией HTLV-I в лейкозные клетки (см. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02631746>); а также ассоциированные с вирусом опухоли при раке желудка, карциноме носоглотки, раке шейки матки, раке влагалища, раке вульвы, плоскоклеточной карциноме головы и шеи и карциноме из клеток Меркеля. (Смотри <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02488759>; смотри также <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT0240886>; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02426892>).

Специалистам в данной области известны и другие виды рака.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В

некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

В другом варианте осуществления рак представляет собой глиобластому.

«Глиобластома», известная как глиобластома и категории IV астроцитомы, является наиболее распространенным и наиболее агрессивным раком, который начинается в головном мозге.

В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой рак легких.

Термины «рак легких» или «опухоль легких» означают физиологическое состояние у млекопитающих, характеризующееся нерегулируемым ростом клеток в тканях легкого. Термин «рак легких» должен относиться к любому раку легких, и охватывает немелкоклеточную карциному легких и мелкоклеточную карциному легких. В одном из вариантов осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (НМРЛ). В другом варианте осуществления рак легких представляет собой мелкоклеточный рак легких (МРЛ).

Используемый в настоящем документе термин «немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)» относится к группе гетерогенных заболеваний, сгруппированных вместе, поскольку их прогноз и лечение примерно одинаковы, и охватывает, согласно гистологической классификации Всемирной организации здравоохранения/Международной ассоциации по изучению рака легких (Travis WD et al. *Histological typing of lung and pleural tumours*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999) следующие виды:

(i) плоскоклеточная карцинома (ПКК), на долю которой приходится от 30% до 40% НМРЛ, начинается в крупных трахеях, но растет медленнее, это означает, что размер этих опухолей варьируется при диагностике;

(ii) аденокарцинома является наиболее распространенным подтипом НМРЛ, на долю которого приходится от 50% до 60% НМРЛ, она начинается вблизи газообменной поверхности легкого и включает подтип, бронхиолоальвеолярную карциному, которая может по-разному реагировать на лечение;

(iii) крупноклеточная карцинома представляет собой быстрорастущую форму, которая растет у поверхности легкого. В основном ее диагностируют методом исключения, и при проведении дополнительных исследований ее обычно переводят в категорию плоскоклеточной карциномы или аденокарциномы;

(iv) аденосквамозная карцинома представляет собой вид рака, который содержит два типа клеток: сквамозные клетки (тонкие, плоские клетки, выстилающие некоторые органы) и железистые клетки;

(v) карциномы с плеоморфными, саркоматоидными или саркоматозными элементами. Это группа редких опухолей, отражающая континуум в гистологической гетерогенности, а также эпителиальной и мезенхимальной дифференциации;

(vi) карциноидная опухоль представляет собой медленно растущую нейроэндокринную опухоль легкого, начинающуюся в клетках, способных выделять гормон в ответ на стимул, подаваемый нервной системой;

(vii) карциномы типа опухоли слюнных желез начинаются в клетках слюнных желез, расположенных внутри крупных дыхательных путей легкого;

(viii) неклассифицированные карциномы включают раковые опухоли, которые не подходят ни под одну из вышеупомянутых категорий рака легких.

В конкретном варианте осуществления НМРЛ выбран из плоскоклеточной карциномы легких, крупноклеточной карциномы легких и аденокарциномы легких.

Используемый в настоящем документе термин «мелкоклеточный рак легких (МРЛ)» означает пролиферацию мелких клеток с уникальными и четкими морфологическими особенностями, содержащих плотные нейросекреторные гранулы, которые придают этой опухоли характер эндокринного/паранеопластического синдрома. В большинстве случаев он возникает в крупных дыхательных путях (первичных и вторичных бронхах). Раковые опухоли этих видов быстро растут и распространяются на ранних стадиях заболевания.

В даже более предпочтительном варианте осуществления рак легких представляет собой аденокарциному, более предпочтительно KRas-индуцируемую аденокарциному легких, предпочтительно, рак, связанный с мутацией в гене KRAS. В одном варианте осуществления мутация в гене KRAS представляет собой мутацию остатка глицина в положении 12, глицина в положении 13 или глутамина в положении 61. В более предпочтительном варианте осуществления мутация выбрана из группы, состоящей из мутации G12S, мутации G12V, мутации G12D, мутации G13D, мутации G12C, мутации G12R, мутации G12F, мутации G12I, мутации G13C, мутации G13R или мутации Q61L. В предпочтительном варианте осуществления мутация представляет собой мутацию G12D. В другом варианте осуществления рак легких представляет собой KRas^{G12D}/p53-индуцируемый рак легких, предпочтительно KRas^{G12D}/p53-индуцируемый НМРЛ.

В одном из вариантов осуществления рак представляет собой первичную опухоль. Используемый в настоящем документе термин «первичная опухоль» относится к опухоли, которая возникла в том участке тела или органе, в котором она находится, и не метастазировала в этот участок из другого участка.

В другом варианте осуществления рак представляет собой метастаз рака. В контексте настоящего изобретения «метастаз» означает распространение раковой опухоли из органа, где она возникла, в другой орган. Обычно это происходит через кровеносную или лимфатическую систему. Когда раковые клетки распространяются и образуют новую опухоль, последняя называется вторичной или метастатической. Раковые клетки, образующие вторичную опухоль, похожи на клетки первоначальной опухоли. Если, например, рак молочной железы распространяется (метастазирует) в легкое, вторичная опухоль формируется из злокачественных клеток рака молочной железы. Болезнь в легком представляет собой метастатический рак молочной железы, а не рак легкого. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинация или композиция по изобретению способна уменьшать клеточную пролиферацию независимо от того, наблюдается ли при раке повышенная экспрессия или активность белка Мус. В

предпочтительном варианте осуществления рак, который предотвращают или лечат, представляет собой Мус-индуцируемый рак.

В одном из вариантов осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

Все комбинации соединений по изобретению и виды рака охвачены настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления комбинация или композиция по изобретению приводит к остановке роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления комбинация или композиция по изобретению приводит к уменьшению размера опухоли (например, объема или массы) на по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% или 99% относительно размера опухоли до лечения. В некоторых вариантах осуществления комбинация или композиция по изобретению приводит к уменьшению количества опухоли у пациента на по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% или 99% относительно количества опухоли до лечения.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к любому животному, имеющему рак или проявляющему симптом рака, или имеющему риск развития рака или проявления симптома рака. Соответствующие субъекты (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных, а также домашних животных или домашних любимцев (таких как кошки или собаки). Включены также не являющиеся людьми приматы и, предпочтительно, пациенты-люди. Предпочтительно, субъект является млекопитающим, наиболее предпочтительно человеком.

Комбинации или композиции для применения в предотвращении и/или лечении рака можно вводить с использованием любого количества и любого пути введения, которые эффективны для лечения или уменьшения степени тяжести рака. Точное необходимое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от биологического вида, возраста и общего состояния здоровья субъекта, степени тяжести заболевания или состояния, конкретного средства, способа его введения, и тому подобного. Соединения по изобретению предпочтительно сформулированы в стандартной лекарственной форме для легкости введения и единообразия дозы. Используемый в настоящем документе термин «стандартная лекарственная форма» означает физически дискретную единицу средства, подходящую для пациента, получающего лечение. Следует понимать, однако, что общее суточное количество соединений и композиций по настоящему изобретению будет определять лечащий врач в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента или организма будет зависеть от различных факторов, включая заболевание, подвергаемое лечению, и степень тяжести заболевания; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в сочетании или

совместно с конкретным используемым соединением, и тому подобных факторов, известных в области медицины.

В предпочтительном варианте осуществления компонент (i) по изобретению, предпочтительно полипептид или его функционально эквивалентный вариант, или конъюгат, синергически взаимодействует с иммуноонкологическим средством комбинации или композиции в лечении рака (для достижения терапевтического эффекта).

В частности, в более предпочтительном варианте осуществления комбинация или фармацевтическая композиция для применения в предотвращении и/или лечении рака представляет собой комбинацию или фармацевтическую композицию, в которой полипептид или его функционально эквивалентный вариант, или конъюгат, находится в количестве, в котором он синергически взаимодействует с иммуноонкологическим средством в лечении рака.

Термины «синергический эффект» или «синергическое взаимодействие» используют взаимозаменяемо. Синергический эффект представляет собой эффект, который больше, чем аддитивный эффект, который можно было бы предсказать путем суммирования фактических эффектов отдельных средств *in vitro*. *In vivo* синергический эффект представляет собой физиологический эффект, и в частности, терапевтический эффект, который больше, чем аддитивный эффект, который можно было бы предсказать путем суммирования фактических эффектов отдельных средств *in vivo*.

Таким образом, при введении двух средств они совместно обеспечивают поддающийся измерению физиологический эффект, и в частности, терапевтический эффект, если фактический эффект совместно введенных средств больше, чем эффект, который можно было бы предсказать путем суммирования фактических терапевтических эффектов отдельных средств. В частности, синергический эффект имеет место, когда первое средство отдельно обеспечивает некоторый поддающийся измерению эффект, второе средство отдельно обеспечивает некоторый поддающийся измерению эффект, и совместно два средства обеспечивают больший поддающийся измерению эффект, чем суммарный эффект обоих отдельных средств. Более конкретно, синергический эффект имеет место, когда первое средство отдельно обеспечивает некоторый поддающийся измерению эффект, второе средство отдельно обеспечивает некоторый поддающийся измерению эффект, и совместно два средства обеспечивают больший поддающийся измерению эффект, чем эффект, обеспечиваемый только вторым средством. Даже более конкретно, синергический эффект имеет место, когда ни первое средство отдельно, ни второе средство отдельно, не обеспечивают какой-либо поддающийся измерению эффект, но совместно два средства обеспечивают поддающийся измерению эффект. Поскольку компоненты (i) и (ii) действуют синергически, количество компонентов (i) и/или (ii) комбинаций или композиций по изобретению может быть меньше, чем количество, необходимое при монотерапии с использованием только одного из них в качестве терапевтического средства. Предпочтительно, в этих комбинациях или композициях можно вводить дозу, составляющую 0,01-1000 мкг/кг массы тела/сутки одного или

другого терапевтического средства.

Количество терапевтических средств в комбинациях или композициях может быть не больше, чем количество, которое обычно было бы введено в композиции, содержащей это терапевтическое средство в качестве единственного активного средства. Предпочтительно, количество терапевтического средства в настоящих композициях будет находиться в диапазоне от примерно 50% до 100% от количества, обычно присутствующего в композиции, содержащей данное средство в качестве единственного терапевтически активного средства. В некоторых вариантах осуществления одно терапевтическое средство вводят в дозе, составляющей примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95% от количества, обычно вводимого в случае этого средства. Используемое в настоящем документе выражение «обычно вводимое» означает количество одобренного FDA терапевтического средства, вводимого в соответствии с одобренной FDA вложенной в упаковку инструкцией.

Комбинацию или композицию по изобретению можно также использовать в комбинации с известными терапевтическими процедурами, например, в комбинации с химиотерапией, радиотерапией, иммунотерапией, фототерапией, хирургическим вмешательством, гормонами, или их сочетанием.

В предпочтительном варианте осуществления комбинация или фармацевтическая композиция для применения в лечении и/или предотвращении рака предназначена для лечения рака легких, предпочтительно НМЖЛ, более предпочтительно KRas-индуцируемого рака, даже более предпочтительно KRAS^{G12D}-индуцируемого рака, при этом первый компонент, предпочтительно полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, более предпочтительно полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 1, вводят интраназально; и при этом второй компонент, предпочтительно антагонист белка, ингибирующего Т-клеточную активацию, более предпочтительно анти-PD-1 или анти-CTLA-4, даже более предпочтительно анти-PD-1 антитело или анти-CTLA-4 антитело, вводят системно, предпочтительно парентерально, даже более предпочтительно внутривенно. В предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят четыре раза в неделю. В предпочтительном варианте осуществления второй компонент вводят один раз в неделю. В более предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят четыре раза в неделю, и второй компонент вводят один раз в неделю. В одном из вариантов осуществления первый и второй компоненты вводят последовательно, то есть, введение первого компонента прекращают перед началом введения второго компонента. В предпочтительном варианте осуществления лечение продолжают в течение по меньшей мере четырех недель. В предпочтительном варианте осуществления первый и второй компоненты вводят в разные дни. В предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят в день 1, 2, 4 и 5, и второй компонент вводят в день 3. В предпочтительном варианте осуществления совместного введения первый и второй компоненты вводят в разные дни, предпочтительно первый компонент

вводят в день 1, 2, 4 и 5, и второй компонент вводят в день 3. В предпочтительном варианте осуществления соотношение между количествами компонента (i) и компонента (ii) может находиться в диапазоне от 50:1 до 1:50, в частности, от 20:1 до 1:20, от 1:10 до 10:1 или от 5:1 до 1:5, предпочтительно от 1:1 до 1:5, более предпочтительно от 1:1 до 1:3. В более предпочтительном варианте осуществления соотношение может находиться в диапазоне от 1:1 до 1:1,5, предпочтительно от 1:1,3 до 1:1,4, более предпочтительно 1:1,34. В другом предпочтительном варианте осуществления соотношение находится в диапазоне от 1:1 до 1:2,8, предпочтительно от 1:2,6 до 1:2,7, более предпочтительно 1:2,67. Эти соотношения предпочтительно представляют собой соотношения по массе.

В предпочтительном варианте осуществления комбинация или фармацевтическая композиция для применения в лечении и/или предотвращении рака предназначена для лечения рака легких, предпочтительно НМРЛ, более предпочтительно KRas-индуцируемого рака, даже более предпочтительно KRAS^{G12D}-индуцируемого рака, предпочтительно KRAS^{G12D}/p53-индуцируемого рака, при этом первый компонент, предпочтительно полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, более предпочтительно полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 1, вводят внутривенно; и при этом второй компонент, предпочтительно антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, более предпочтительно анти-PD-1 или анти-CTLA-4, даже более предпочтительно анти-PD-1 антитело или анти-CTLA-4 антитело, даже более предпочтительно анти-PD-1 антитело, вводят системно, предпочтительно парентерально, даже более предпочтительно внутривенно. В предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят два раза в неделю. В предпочтительном варианте осуществления второй компонент вводят один раз в неделю. В более предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят два раза в неделю, и второй компонент вводят один раз в неделю. В одном из вариантов осуществления первый и второй компоненты вводят последовательно, то есть, введение первого компонента прекращают перед началом введения второго компонента. В другом варианте осуществления первый и второй компоненты вводят одновременно, предпочтительно один раз в неделю. В предпочтительном варианте осуществления лечение продолжают в течение по меньшей мере трех недель, предпочтительно в течение по меньшей мере четырех недель. В предпочтительном варианте осуществления первый и второй компоненты вводят в разные дни. В предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят в дни 2 и 5, и второй компонент вводят в день 3. В предпочтительном варианте осуществления совместного введения первый и второй компоненты вводят в разные дни, предпочтительно первый компонент вводят в дни 2 и 5, и второй компонент вводят в день 3. В более предпочтительном варианте осуществления первый компонент вводят в течение некоторого периода времени, предпочтительно по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, более предпочтительно 10 дней, перед введением второго компонента. В одном из вариантов осуществления введение первого компонента прекращают перед началом введения второго соединения. В

предпочтительном варианте осуществления соотношение между количествами компонента (i) и компонента (ii) может находиться в диапазоне от 50:1 до 1:50, в частности, от 20:1 до 1:20, от 1:10 до 10:1 или от 5:1 до 1:5. В другом конкретном варианте осуществления соотношение между количествами находится в диапазоне от 30:1 до 5:1, предпочтительно от 30:1 до 8:1, более предпочтительно от 25:1 до 15:1, более предпочтительно от 20:1 до 10:1. В одном из вариантов осуществления соотношение составляет 20:1. В другом варианте осуществления соотношение составляет 10:1. Эти соотношения предпочтительно представляют собой соотношения по массе.

Все варианты осуществления комбинации по изобретению также применимы к терапевтическим способам по изобретению.

Изделия и наборы

Изобретение также относится к изделиям, включающим любую из комбинаций или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе, в одном или более контейнерах. В некоторых вариантах осуществления изделие включает, например, брошюру, печатные инструкции, этикетку или вкладыш в упаковку с инструкциями для пользователя (например, дистрибьютора или конечного пользователя) по комбинированию и/или применению композиций изделия для предотвращения и/или лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления изделие включает, например, бутылку(и), флакон(ы), картридж(ы), коробку(и), шприц(ы), инжектор(ы) или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления этикетка относится к применению или введению комбинаций или фармацевтических композиций в изделия способами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых аспектах этикетка описывает, например, предложенный режим применения, режим лечения, предотвращения или облегчения рака.

Содержание всех цитируемых ссылок (включая литературные источники, патенты, патентные заявки и сайты), которое может быть упомянуто в тексте настоящей заявки, специально включено посредством ссылки в полном объеме для любых целей, как и ссылки, приведенные в них.

Все используемые в настоящем документе термины, если нет иных указаний, имеют их обычное значение, известное в данной области. Другие, более конкретные определения определенных терминов, используемых в настоящей заявке, являются такими, как указано ниже, и предназначены для единообразного применения во всем описании и формуле изобретения, если иное явно изложенное определение не используется в более широком смысле. Во всем тексте описания и формулы изобретения слово «включает» и его вариации не предназначены для исключения других технических признаков, добавок, компонентов или этапов. Более того, слово «включает» охватывает вариант «состоит из». Дополнительные объекты, преимущества и признаки изобретения станут понятными специалистам в данной области при изучении описания, или могут стать понятными при осуществлении на практике изобретения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные сочетания особых и конкретных вариантов

осуществления, описанных в настоящем документе.

В настоящей спецификации и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа терминов включает соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Термин «один из», а также термины «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, при использовании в настоящем документе «и/или» следует воспринимать как конкретное описание каждого из двух конкретных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, в настоящем документе термин «и/или» при использовании в таком выражении, как «А и/или В», должен включать «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» при использовании в таком выражении, как «А, В и/или С» должен включать каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно). Термин «примерно», используемый в сочетании с числовым значением в тексте спецификации и формулы изобретения, обозначает интервал точности, знакомый и приемлемый для специалиста в данной области. Как правило, такой интервал точности составляет $\pm 15\%$. Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Единицы, префиксы и символы приведены в форме, принятой для них в *Système International de Unites* (системе СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если нет иных указаний, аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от амино- к карбоксильному концу. Заголовки, приведенные в настоящем документе, не ограничивают различные аспекты изобретения, которые могут быть поняты при обращении к спецификации в целом. Соответственно, более полное определение терминов, приведенных непосредственно ниже, можно получить при обращении к полному изложению спецификации.

Изобретение далее описано с помощью следующих примеров, которые следует рассматривать исключительно как иллюстративные и не ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Получение и очистка Ототус

Последовательность пептида SEQ ID NO: 4, включая метионин на N-конце, обратно транскрибировали, кодон-оптимизировали для экспрессии в *E. coli*, клонировали в экспрессионный вектор pET3a (Novagen) и очищали из арабиноза-индуцируемого (Invitrogen[®]) бактериального штамма BL21 (DE3) с использованием протоколов, адаптированных из протокола очистки Max, описанного в публикациях J.-F. Naud et al. 2003. *J Mol Biol*, 326:1577-1595; F.-O. и Mcduff et al. 2009. *J Mol Recognit*, 22:261-269). Полученная очищенная конструкция представляла собой полипептид с SEQ ID NO: 4. Подлинность каждой очищенной конструкции подтверждали масс-спектрометрией и

вестерн-блот анализом. Омотус очищали катионообменной хроматографией, и чистоту подтверждали масс-спектрометрическим анализом, SDS-ПААГ и УФ-спектроскопией. Для *in vivo* введений выполняли дополнительный этап очистки с целью удаления эндотоксинов с использованием набора для удаления эндотоксина ToxinEraser™ (Genscript). Концентрацию эндотоксина определяли с использованием набора Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Thermo Scientific). Замену буфера производили в ячейке Amicon Ultra-15 (MerckMillipore) с пределом исключения 3 кДа.

Интраназальное введение Омотус увеличивало рекрутинг Т-лимфоцитов специфически к зоне опухоли

Мышей KRas^{LSL-G12D/+} генотипировали в Transnetyx, и создание опухолей легких у самцов и самок проводили, как описано ранее (E.L. Jackson. 2001. Genes & Development, 15:3243-3248). У животных поддерживали смешанный генетический фон C57BL/6J x FVBN. Использовали минимум 5 мышей на временную точку, их распределяли в группы случайным образом, и лечение начинали через 14-16 недель после инфицирования Adeno-Cre, когда у мышей развивались опухоли, обнаруживаемые методом микро-КТ. Животных анестезировали ингаляцией изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и и/н вводили либо полипептид Омотус (2,4 мг/кг), либо растворитель (10 мМ ацетат натрия, pH 6,5) в общем объеме 30 мкл четыре раза в неделю (1101100) в течение либо одной, либо четырех недель.

После завершения эксперимента мышей умерщвляли, легкие вырезали и перфузировали через трахею 4% PFA, фиксировали в течение ночи, переносили в 70% этанол, заливали парафином и получали 4-мкм срезы. Для исследований иммунофлуоресценции CD3 извлечение антигена проводили путем нагревания в течение 20 мин при 400 Вт в микроволновой печи в 0,01 М цитратном буфере, pH 6,0. После блокирования в течение 1 часа в 3% БСА плюс 0,05% твин 20 микропрепараты инкубировали в течение при 4°C с анти-CD3 (Dako A0452) в разведении 1/100 в готовом разбавителе Dako (Dako S2022). После промывания PBS микропрепараты инкубировали с конъюгатом козьих антител против IgG кролика (H+L) с AlexaFluor®488 (Thermo Fisher Scientific A-11008) и окрашивали DAPI (Life Technologies D1306) в разведении 1/10000, промывали PBS и заливали заливочной средой для измерения флуоресценции (Dako S3023). Изображения получали с использованием Nikon C2+ конфокального микроскопа и программы NIS-elements. Получали пять изображений репрезентативных площадей опухоли для каждой мыши и определяли среднее количество CD3⁺ клеток на площадь.

Иммунологическое окрашивание анти-CD3 показало, что введение Омотус увеличивает рекрутинг Т-лимфоцитов специфически к зоне опухоли уже через 1 неделю после начала введения, и Т-клетки оставались там на протяжении всего лечения (Фиг. 1А), свидетельствуя о возможном иммунном вкладе как части механизма действия полипептида Омотус.

Интраназальное введение Омотус вызывает рекрутинг активированных CD4 Т-клеток к зоне опухоли

Экспериментальная модель и лечение Омомус являются такими, как описано ранее.

После завершения эксперимента мышей умерщвляли, легкие вырезали, расщепляли с использованием набора для расщепления мышинных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Перед окрашиванием мертвые клетки окрашивали Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences 564406) в соответствии с инструкциями производителя. Затем неспецифические участки связывания блокировали путем инкубации с анти-CD16/32 антителом в течение 10 минут при комнатной температуре. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 20 минут при 4°C в темноте. Используемые антитела приведены в Таблице 1. Для внутриклеточного окрашивания FoxP3 использовали набор буферов для фактора транскрипции FoxP3 (eBioscience 00-5523-00) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подсчитывали при помощи цитометра CytoFlex (Beckman Coulter), и данные анализировали с использованием программы CytoExpert 2.0 (Beckman Coulter).

На Фигуре 1В представлены результаты FACS-анализа, показывающие, что Омомус индуцирует рекрутинг CD4 Т-клеток к опухоли, и что они являются активированными. Действительно, эти клетки демонстрируют повышенные уровни PD-1, а также молекул PD-1 и Tim-3, свидетельствуя о том, что Омомус индуцирует противоопухолевый иммунный ответ. Кроме того, Омомус также индуцирует размножение регуляторных Т-клеток (Treg).

Системное введение Омомус вызывает рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли

Для исследований с Kras/p53 сингенной моделью 1×10^6 клеток MuH-163 инокулировали подкожно в дорсальную часть бока самкам мышей C57BL/6 (JANVIER LABS) в возрасте 7 недель. После формирования опухолей и достижения ими объема примерно 100 мм^3 , мышей случайным образом распределяли в две группы и вводили им внутривенно растворитель (PBS pH 7,0) или Омомус (32 мг/кг) один раз в неделю. После трех недель лечения мышей умерщвляли, опухоли иссекали и разрезали на две части. Затем одни половины опухолей фиксировали в течение ночи в 4% PFA, переносили в 70% этанол, заливали парафином и получали 4-мкм срезы. Для исследований иммунофлуоресценции CD3 извлечение антигена проводили путем нагревания в течение 20 мин при 400 Вт в микроволновой печи в 0,01 М цитратном буфере, pH 6,0. После блокирования в течение 1 часа в 3% БСА плюс 0,05% твин 20 микропрепараты инкубировали в течение при 4°C с анти-CD3 (Dako A0452) в разведении 1/100 в готовом разбавителе Dako (Dako S2022). После промывания PBS микропрепараты инкубировали с конъюгатом козьих антител против IgG кролика (H+L) с AlexaFluor[®]488 (Thermo Fisher Scientific A-11008) и окрашивали DAPI (Life Technologies D1306) в разведении 1/10000, промывали PBS и заливали заливочной средой для измерения флуоресценции (Dako S3023). Изображения получали с использованием моторизованного флуоресцентного микроскопа Nikon Tie и программы NIS-elements. Получали четыре изображения

репрезентативных площадей опухоли для каждой мыши и определяли среднее количество CD3⁺ клеток на площадь.

Для анализа методом проточной цитометрии проводили расщепление других половин опухолей с использованием набора для расщепления мышинных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Перед окрашиванием мертвые клетки окрашивали Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences 564406) в соответствии с инструкциями производителя. Затем неспецифические участки связывания блокировали путем инкубации с анти-CD16/32 антителом в течение 10 минут при комнатной температуре. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 20 минут при 4°C в темноте. Используемые антитела приведены в Таблице 1. Клетки подсчитывали при помощи цитометра CytoFlex (Beckman Coulter), и данные анализировали с использованием программы CytoExpert 2.0 (Beckman Coulter).

Введение Омомус индуцировало рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли (Фигура 2А). Омомус вызывал рекрутинг большего количества CD8 Т-клеток к опухоли, и значительно большего количества CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих молекулы как PD-1, так и Tim-3 (Фигура 2В).

Омомус в комбинации с анти-PD-1 вызывает рекрутинг CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ Т-клеток к опухоли

Мышей KRas^{LSL-G12D/+} генотипировали в Transnetyx, и создание опухолей легких у самцов и самок проводили, как описано ранее (E.L. Jackson. 2001. Genes & Development, 15:3243-3248). У животных поддерживали чистый генетический фон C57BL/6. Использовали минимум 5 мышей на временную точку, их распределяли в группы случайным образом, и лечение начинали через 14-16 недель после инфицирования Adeno-Cre, когда у мышей развивались опухоли, обнаруживаемые методом микро-КТ. Мышей случайным образом распределяли в 4 группы: растворитель+контрольное по изотипу крысиное IgG2a, k, Омомус+контрольное по изотипу крысиное IgG2a, k, растворитель+анти-PD-1 и Омомус+анти-PD-1. Для введения Омомус животных анестезировали вдыханием изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и интраназально вводили либо полипептид Омомус (2,4 мг/кг), либо растворитель (PBS pH=7) в общем объеме 30 мкл четыре раза в неделю (1101100). Анти-PD-1 (BioXCell BE0146) или его контроль по изотипу, крысиное антитело IgG2a, k (BioXCell BE0089), вводили внутрибрюшинно в дозе 200 мкг/мышь один раз в неделю (0010000) в течение четырех недель.

После завершения эксперимента мышей умерщвляли, легкие вырезали, расщепляли с использованием набора для расщепления мышинных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Перед окрашиванием мертвые клетки окрашивали Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences 564406) в соответствии с инструкциями производителя. Неспецифические взаимодействия блокировали путем инкубации с анти-

CD16/32 антителом в течение 10 минут при комнатной температуре. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 20 минут при 4°C в темноте. Используемые антитела приведены в Таблице 1. Клетки подсчитывали при помощи цитометра CytoFlex (Beckman Coulter), и данные анализировали с использованием программы CytoExpert 2.0 (Beckman Coulter).

Комбинация Омомус и терапевтического средства анти-PD-1 значительно увеличивает рекрутинг CD4+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, но не Tim-3, к зоне опухоли в сравнении с группами введения как растворителя, так и только анти-PD-1 (Фигура 3). Этот результат указывает на то, что комбинация Омомус с анти-PD-1 оказывает синергический эффект, стимулируя противоопухолевый иммунный ответ. Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что экспрессия PD-1 на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (ОИЛ) точно определяет репертуар клонально размноженных опухоль-реактивных клеток (Gros A et al., *J Clin Invest* (2014) 124(5): 2246-2259). В этом русле, хотя PD-1 и приводит к ингибирующему сигналу при связывании со своими лигандами (PD-L1 и PD-L2), теперь ясно, что экспрессия PD-1 сначала является маркером активации Т-клеток и высокоавидных ОИЛ, специфичных для опухолевых антигенов (обзор в публикации Simon S and Labarriere N. *OncoImmunology* (2018). 7:1, e1364828).

Омомус в комбинации с анти-PD-1 индуцирует продуцирование IFN- γ

Экспериментальная модель, лечение Омомус и анти-PD-1 являются такими, как описано ранее.

После завершения эксперимента мышей умерщвляли, легкие вырезали, расщепляли с использованием набора для расщепления мышечных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Перед окрашиванием мертвые клетки окрашивали Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences 564406) в соответствии с инструкциями производителя. Неспецифические взаимодействия блокировали путем инкубации с анти-CD16/32 антителом в течение 10 минут при комнатной температуре. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 20 минут при 4°C в темноте. Используемые антитела приведены в Таблице 1. Для окрашивания на IFN- γ собранные и диссоциированные опухолевые клетки стимулировали РМА плюс иономицин (оба от компании Sigma-Aldrich) в присутствии моненсина и бифельдрина А (оба от компании BD Biosciences) в течение 12 часов. Клетки собирали и окрашивали для анализа методом проточной цитометрии. Для внутриклеточного окрашивания IFN- γ использовали набор буферов BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences 554722) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подсчитывали при помощи цитометра CytoFlex (Beckman Coulter), и данные анализировали с использованием программы CytoExpert 2.0 (Beckman Coulter).

Эти эксперименты показали, что комбинированная терапия Омомус плюс анти-PD-1 в значительной степени вызывает продуцирование интерферона γ (IFN- γ) как CD4+ хелперами, так и CD8+ цитотоксическими внутриопухолевыми Т-клетками (Фигура 4), в

сравнении с введением растворителя, факт, который не был замечен ни в группе введения Ототус, ни в группе введения анти-PD-1.

За последние несколько лет накопилось значительное количество доказательств, свидетельствующих о критической роли IFN- γ в стимуляции отторжения и клиренса опухолей. Данный цитокин в основном продуцируется активированными Т и НК-клетками, и проявляет свой противоопухолевый эффект, непосредственно индуцируя антипролиферативное, проапоптотическое и некротическое действие на опухолевые клетки, и повышая иммуногенность за счет индукции повышающей регуляции молекул главного комплекса гистосовместимости (подробный обзор в публикации Castro F et al., *Front. Immunol.* (2018). 9:847 и в публикации Ikeda H et al., *Cytokine & Growth Factors Reviews* (2002). 13 95-109). Более того, этот цитокин также оказывает воздействие на микроокружение опухоли, ухудшая ангиогенез за счет ингибирования пролиферации и выживания эндотелиальных клеток, окружающих опухоль, и, таким образом, вызывая ишемию в зоне опухоли, это важный механизм, который приводит к отторжению опухоли (Beatty G and Paterson Y. *J Immunol* (2001) 166:2276-82, Kammertoens T et al., *Nature* (2017) 545:98-102 и Briesemeister D et al., *Int J Cancer* (2011) 128:371-8). Кроме того, продуцирование IFN- γ Th1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками усиливает клиренс опухоли, поскольку данный цитокин имеет решающее значение для направленной миграции Т и НК-клеток к зоне опухоли (Melero I et al., *Cancer Discov* (2014) 4:522-6). Кроме того, IFN- γ также играет ключевую роль в активации макрофагов и стимуляции их туморицидной активности (Celada A et al., *J Exp Med* (1984) 160:55-74). Важно отметить, что повышенные уровни IFN- γ являются прогностическим биомаркером ответа на химиотерапию и радиотерапию, а также на анти-PD-1 и анти-CLTA-4 иммунотерапию (Karachaliou N et al., *Ther Adv Med Oncol* (2018) 10:1758834017749748 и Mo X et al., *Cancer Res* (2018) 78:436-50). Закономерно, что в последних клинических испытаниях уже получены многообещающие результаты, демонстрирующие связь между продуцирующими IFN- γ эффекторными Т-клетками и ингибированием роста опухолей (Liakou CI et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:14987-92, Peng W et al., *Cancer Res* (2012) 72:5209-18 и Overacre-Delgoffe AE et al., *Cell* (2017) 169:1130-41.e11).

Антитело к	Флуорохром	Клон	Производитель	Каталожный номер
CD16/32	-	93	Biolegend	101302
CD45	BV605	30-F11	Biolegend	103140
CD3e	FITC	145-2C11	eBioscience	11-0031
CD4	PerCP-eFluor710	RM4-5	eBioscience	46-0042
CD8a	APC-H7	53-6.7	BD Biosciences	560182
PD-1	BV421	29F.1A12	Biolegend	135218
Tim-3	PE-CY7	RMT3-23	eBioscience	25-5870

IFN- γ	APC	XMG1.2	BD Bioscience	554413
---------------	-----	--------	---------------	--------

Таблица 1: Анти-мышинные антитела, используемые для проточно-цитометрического анализа

Комбинация Омомус с анти-PD-1 антителом синергически увеличивает относительную долю здоровых легких и приводит к рекрутингу Т-клеток к зоне опухоли.

Мышей KRas^{LSL-G12D/+} генотипировали в Transnetyx, и создание опухолей легких у самцов и самок проводили, как описано ранее (Jackson, E.L., et al., Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. Genes Dev, 2001. 15(24): p. 3243-8). У животных поддерживали чистый генетический фон C57BL/6. Через 14-16 недель после инфицирования Adeno-Cre, когда у мышей развивались опухоли, обнаруживаемые методом микро-КТ, их случайным образом распределяли в 4 группы, получающие следующее лечение в течение 4 недель: растворитель+контрольное по изотипу крысиное IgG2a, k, Омомус+контрольное по изотипу крысиное IgG2a, k, растворитель+анти-PD-1 и Омомус+анти-PD-1. Для введения Омомус животных анестезировали вдыханием изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и интраназально вводили либо полипептид Омомус (3,75 мг/кг), либо растворитель (PBS, pH=7) в общем объеме 30 мкл четыре раза в неделю (1101100). Анти-PD-1 (BioXCell BE0146) или его контроль по изотипу, крысиное антитело IgG2a, k (BioXCell BE0089), вводили в дозе 5 мг/кг внутривентриально один раз в неделю (0010000) в течение четырех недель.

Микро-КТ исследования проводили с использованием системы визуализации Quantum FX (Perkin Elmer. 940 Winter St. Waltham, Massachusetts. EEUU), и реконструкция изображения была основана на методе Фельдкамп. Для определения объема грудной клетки использовали аналитическую программу Quantum FX. Во-первых, измеряли расстояние между противоположными ребрами на уровне кия (r2). Второй показатель определяли как максимальное расстояние от уровня кия до диафрагмальной купулы (h). Последним показателем была высота грудной клетки, определяемая как расстояние между грудиной и подпоясничной мышцей на уровне диафрагмальной купулы (r1). С помощью этих трех значений был рассчитан объем усеченного конуса с использованием следующей математической формулы:

$$\text{Объем} = \text{Высота} * \pi / 3 * (r1^3 - r2^3) / (r1 - r2)$$

Количество здоровой ткани легких рассчитывали пороговым методом с использованием программы AMIDE (Amide[©] Andreas Loening). Данный порог выбирает полное количество вокселей в изображении, значение интенсивности которых входит в диапазон -950/-350 серых оттенков. Этот диапазон серой шкалы был выбран вручную после изучения различных исследований.

И наконец, были рассчитаны соотношения здоровых легких/грудной клетки на основании представления о том, что полный объем грудной клетки сохраняется, в то время как объем здоровых легких постепенно уменьшается по мере прогрессирования патологии. У животных, получавших Омомус в комбинации с анти-PD-1, наблюдалась

повышенная относительная доля здоровых легких в сравнении с группами введения растворителя и только лекарственного средства (Фигура 5А и 5В).

После завершения эксперимента мышей умерщвляли, легкие вырезали, расщепляли с использованием набора для расщепления мышечных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Перед окрашиванием мертвые клетки окрашивали Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences 564406) в соответствии с инструкциями производителя. Неспецифические перекрестные реакции блокировали путем инкубации с анти-CD16/32 антителом в течение 10 минут при комнатной температуре. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 20 минут при 4°C в темноте. Используемые антитела приведены в Таблице 2.

Антитело к	Флуорохром	Клон	Производитель	Каталожный номер
CD16/32	-	93	Biolegend	101302
CD45	BV605	30-F11	Biolegend	103140
CD3e	FITC	145-2C11	eBioscience	11-0031
CD4	PerCP-eFluor710	RM4-5	eBioscience	46-0042
CD8a	APC-H7	53-6.7	BD Biosciences	560182
PD-1	BV421	29F.1A12	Biolegend	135218
Tim-3	PE-CY7	RMT3-23	eBioscience	25-5870
IFN- γ	APC	XMG1.2	BD Bioscience	554413
IL-17	PE	TC11-18H10	BD Bioscience	559502

Таблица 2. Анти-мышинные антитела, используемые для проточно-цитометрического анализа

Для окрашивания на IFN- γ и IL-17 собранные и диссоциированные опухолевые клетки стимулировали РМА плюс иономицин (оба от компании Sigma-Aldrich) в присутствии моненсина и бифельдрина А (оба от компании BD Biosciences) в течение 12 часов. Затем клетки собирали и окрашивали для анализа методом проточной цитометрии. Для внутриклеточного окрашивания IFN- γ использовали набор буферов BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences 554722) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подсчитывали при помощи цитометра CytoFlex (Beckman Coulter), и данные анализировали с использованием программы CytoExpert 2.0 (Beckman Coulter).

На Фигуре 5С показано, что Омомус и анти-PD-1, введенные в комбинации, индуцировали рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности CD4 Т-клеток и Th1/Th17 клеток. В Таблице 3 показано, что достигнутый эффект является синергическим. Считается, что имеет место синергия, когда увеличение интересующей популяции иммуноцитов превышает суммарное увеличение при индивидуальном введении.

	Растворитель	Омомус	PD-1	Омо+PD-1
--	--------------	--------	------	----------

%CD3 (среднее)	15,78	16,61	16,69	18,62
Увеличение в сравнении с растворителем		0,83	0,91	2,84
Сумма отдельных видов лечения		1,74		Синергия
%CD4 (среднее)	6,981	9,623	8,003	10,75
Увеличение в сравнении с растворителем		2,642	1,022	3,769
Сумма отдельных видов лечения		3,664		Синергия
%Th1/Th17 (среднее)	3,424	6,707	3,148	8,054
Увеличение в сравнении с растворителем		3,283	-0,276	4,63
Сумма отдельных видов лечения		3,007		Синергия

Таблица 3. Средние значения для каждой популяции иммуноцитов

Комбинация Омотус с анти-CTLA-4 антителом синергически приводит к уменьшению роста опухоли и рекрутингу противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли

Экспериментальная модель, микро-КТ сканирование и окрашивание для FACS были такими, как описано для Фигуры 5.

Через 14-16 недель после инфицирования Adeno-Cre, когда у мышей развивались опухоли, обнаруживаемые методом микро-КТ, их случайным образом распределяли в 4 группы, получающие следующее лечение в течение 4 недель: растворитель+контрольное по изотипу IgG сирийского хомяка, Омотус+контрольное по изотипу IgG сирийского хомяка, растворитель+анти-CTLA-4 и Омотус+анти-CTLA-4. Для введения Омотус животных анестезировали вдыханием изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и интраназально вводили либо полипептид Омотус (3,75 мг/кг), либо растворитель (PBS, pH=7) в общем объеме 30 мкл четыре раза в неделю (1101100). Анти-CTLA-4 (BioXCell BE0131) или его контроль по изотипу, IgG сирийского хомяка (BioXCell BE0087), вводили в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно один раз в неделю (0010000) в течение четырех недель.

На Фигуре 6А показано, что у животных, получавших Омотус в комбинации с анти-CTLA-4, наблюдался меньший рост опухоли в сравнении с введением растворителя и только лекарственного средства. На Фигуре 6В показано, что Омотус и анти-CTLA-4, введенные в комбинации, индуцировали рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности CD4 Т-клеток, а также как CD4, так и CD8 PD-1⁺ Т-клеток. В Таблице 4 показано, что достигнутый эффект является синергическим. Считается, что имеет место синергия, когда увеличение интересующей популяции иммуноцитов превышает суммарное увеличение при индивидуальном введении.

	Растворитель	Омотус	PD-1	Омо+PD-1
%CD3 (среднее)	25,53	27,61	29,38	31,58
Увеличение в сравнении с растворителем		2,08	3,85	6,05
Сумма отдельных видов лечения		5,93		Синергия
%CD4 (среднее)	9,394	10,96	11,97	15,29
Увеличение в сравнении с растворителем		1,566	2,576	5,896
Сумма отдельных видов лечения		4,141		Синергия

%CD4+PD-1+ (среднее)	43,49	52,69	46,45	67,66
Увеличение в сравнении с растворителем		9,2	2,96	24,17
Сумма отдельных видов лечения		12,16		Синергия
%CD8+PD-1+ (среднее)	35,8	38,87	42,33	52,5
Увеличение в сравнении с растворителем		3,07	6,53	16,7
Сумма отдельных видов лечения		9,6		Синергия

Таблица 4. Средние значения для каждой популяции иммуноцитов

Введенные последовательно в комбинации Отомус и анти-PD-1 антитело синергически приводят к рекрутингу противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли.

Экспериментальная модель, микро-КТ сканирование и окрашивание для FACS были такими, как описано для Фигуры 5.

Через 14-16 недель после инфицирования Adeno-Cre, когда у мышей развивались опухоли, обнаруживаемые методом микро-КТ, их случайным образом распределяли в 4 группы, получающие следующее лечение в течение 4 недель: растворитель, Отомус, растворитель+анти-PD-1 и Отомус+анти-PD-1. Для лечения Отомус животным внутривенно вводили либо полипептид Отомус (50 мг/кг) два раза в неделю в течение 10 дней, либо растворитель (NaAc 24 mM+150 mM NaCl) (0100100). Группе, получавшей комбинацию, вводили в течение первых 10 дней два раза в неделю Отомус. После 10 дней введения Отомус группе, получавшей комбинацию, прекращали вводить Отомус и начинали вводить анти-PD-1 (BioXCell BE0146) в дозе 2,5 мг/кг внутривенно один раз в неделю (0010000) до окончания эксперимента. Группа монотерапии, только Отомус, получала Отомус два раза в неделю в течение первых 10 дней, а затем продолжала получать лечение, но получая препарат только один раз в неделю до окончания эксперимента.

На Фигуре 7 показано, что последовательное введение Отомус, а затем анти-PD-1 индуцировало рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности CD4 Т-клеток, экспрессирующих молекулы как PD-1, так и Tim-3, а также Th1/Th17 Т-клеток, экспрессирующих PD-1. В Таблице 5 показано, что достигнутый эффект является синергическим. Считается, что имеет место синергия, когда увеличение интересующей популяции иммуноцитов превышает суммарное увеличение при индивидуальном введении.

	Растворитель	Отомус	PD-1	Ото+PD-1
%CD4+PD-1+Tim-3+ (среднее)	3,281	3,5	2,739	5,442
Увеличение в сравнении с растворителем		0,219	-0,542	2,161
Сумма отдельных видов лечения		-0,323		Синергия
%Th1/Th17 (среднее)	0,664	0,615	0,501	0,994
Увеличение в сравнении с растворителем		-0,049	-0,163	0,33
Сумма отдельных видов лечения		-0,212		Синергия

Таблица 5. Средние значения для каждой популяции иммуноцитов

Комбинация Омотус, введенного внутривенно, одновременно с анти-PD-1 антителом синергически вызывает рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли

Клетки очень агрессивной линии НМРЛ MuH-163 с мутацией Kras/p53 инокулировали подкожно (1×10^6 клеток) сингенным мышам C57/BL6. После формирования опухолей мышей случайным образом распределяли в 4 группы: растворитель, Омотус, растворитель+анти-PD-1 и Омотус+анти-PD-1. Омотус вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг (0010000), и анти-PD-1 антитело вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг, одновременно один раз в неделю в течение 3 недель. Мышей осматривали два раза в неделю, и рост опухолей контролировали путем измерения штангенциркулем.

После завершения эксперимента опухоли собирали, половину из них фиксировали в 4% PFA и заливали парафином для ИГХ анализа, а вторую половину расщепляли с использованием набора для расщепления мышечных опухолей (Miltenyi) и окрашивали конъюгированными антителами для анализа содержания иммуноцитов методом проточной цитометрии. Окрашивание для FACS и анализ проводили, как описано для Фигуры 5.

Для исследований иммунофлуоресценции CD3 извлечение антигена проводили путем нагревания в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буфере, pH 6,0, в микроволновой печи, установленной на 400 Вт. После блокирования в течение 45 минут в 3% БСА и промывания в PBS микропрепараты инкубировали в течение ночи при 4°C с анти-CD3 (Dako A0452) антителом в разведении 1/100 в готовом разбавителе Dako (Dako S2022). После промывания PBS микропрепараты инкубировали с конъюгатом козьих антител против IgG кролика (H+L) с AlexaFluor[®]488 (Thermo Fisher Scientific A-11008) в разведении 1/200 и окрашивали DAPI (Life Technologies D1306) в разведении 1/10000, промывали один раз водой и заливали заливочной средой для измерения флуоресценции (Dako S3023). Положительное окрашивание на CD3 определяли на основании 5 репрезентативных полученных с помощью флуоресцентного микроскопа изображений для каждого животного при 20-кратном увеличении.

На Фигуре 8 показано, что одновременное введение Омотус и анти-PD-1 в значительной степени вызывает рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли. В Таблице 6 показано, что достигнутый эффект является синергическим. Считается, что имеет место синергия, когда увеличение интересующей популяции иммуноцитов превышает суммарное увеличение при индивидуальном введении.

	Растворитель	Омотус	PD-1	Омо+PD-1
% CD3 (среднее)	190,3	303,6	254,3	368,8
Увеличение в сравнении с растворителем		113,3	64	178,5
Сумма отдельных видов лечения		177,3		Синергия
% CD45 (среднее)	19,25	21,26	23,9	28,03
Увеличение в сравнении с растворителем		2,01	4,65	8,78
Сумма отдельных видов лечения		6,66		Синергия

Таблица 6. Средние значения для каждой популяции иммуноцитов

Высокий уровень экспрессии CD3, CD4, IL-17 и IFN- γ коррелирует с более высокими показателями выживаемости

Строили графики Каплана-Мейера с использованием онлайн программного обеспечения для построения графиков Каплана-Мейера (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>). Для этого была выбрана база данных пациентов с раком легких. В анализ включали НМРЛ всех гистологических типов, всех стадий и всех категорий.

На Фигуре 9 показано, что высокая экспрессия CD3, CD4, IL-17 и IFN- γ коррелирует с более высокими показателями выживаемости у пациентов с НМРЛ.

Обсуждение

Комбинация введенного интраназально Омомус с анти-PD-1 антителом синергически увеличивает относительную долю здоровых легких (среднее 7,969) в общем объеме грудной клетки, в сравнении с улучшением, достигаемым при применении терапевтических средств Омомус (0,86) и анти-PD-1 (0,92) в отдельности (Фигура 5А и 5В). Кроме того, терапевтические средства, введенные одновременно, в значительной степени индуцировали рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, в частности, CD4 Т-клеток и Th1/Th17 клеток, которые, как известно, оказывают мощное противоопухолевое действие (Chatterjee, S., et al., CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab*, 2018. **27**(1): p. 85-100 e8) (Фигура 5С).

В соответствии с этими результатами, комбинация введенного интраназально Омомус с анти-CTLA-4 также приводила к меньшему росту опухолей (1,11) в сравнении с растворителем (3,85) и обоими терапевтическими средствами, введенными отдельно (Омомус: 2,3; а-CTLA-4: 3,0) (Фигура 6А).

Помимо такого непосредственного эффекта на рост опухоли комбинация терапевтических средств также синергически индуцировала рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, особенно CD4 Т-клеток, а также CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих молекулу PD-1 (клеток, как известно, идентифицируемых как опухоль-специфические Т-клетки (Gros, A., et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*, 2014. **124**(5): p. 2246-59) (Фигура 6В). В целом, вводимый интраназально Омомус в комбинации с анти-PD-1 или анти-CTLA-4 приводит к уменьшению роста опухолей и синергически вызывает рекрутинг противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли.

Более того, с использованием той же мышинной модели (Kras^{G12D}-индуцируемого НМРЛ) авторы изобретения показали, что комбинация Омомус, вводимого внутривенно последовательно с анти-PD-1 (сначала Омомус, а затем анти-PD-1 антитело), также проявляет синергию и индуцирует рекрутинг Т-клеток к зоне опухоли, особенно опухоль-специфических CD4 клеток, экспрессирующих молекулы как PD-1, так и Tim-3, и Th1/Th17 противоопухолевых Т-клеток (Фигура 7).

Для подтверждения данного синергического эффекта в другой модели авторы изобретения объединили Омомус и анти-PD-1 в другой модели очень агрессивного

НМРЛ, индуцируемого мутациями как в Kras, так и в p53. Опять-таки, оба лекарственных средства проявили синергию и в значительной степени вызвали рекрутинг большего количества Т-клеток к зоне опухоли (Фигура 8А), а также рекрутинг, в целом, большего количества иммунцитов (Фигура 8В).

Подводя итог, авторы изобретения сделали вывод о том, что введение Омотус в комбинации с обоими, анти-PD-1 и анти-CTLA-4, терапевтическими средствами может приводить к уменьшению роста опухоли и синергически вызывать рекрутинг противоопухолевых Т-клеток к зоне опухоли. Этот терапевтический эффект наблюдался при использовании разных путей введения, разных доз Омотус и разных доз анти-PD-1 и анти-CTLA-4.

Этот рекрутинг иммунцитов оказывает явное терапевтическое действие у онкологических пациентов с НМРЛ, поскольку повышенное относительное количество, в целом, CD3 Т-клеток, CD4 клеток и Т-клеток, секретирующих IFN- γ и IL-17, коррелирует с увеличением выживаемости (Фигура 9). Этот факт подчеркивает важность описанных выше результатов, относящихся к комбинации Омотус с иммуноонкологическим средством. Этот же вывод можно экстраполировать и на другие виды рака, при которых данные, основанные на иммунных сигнатурах, указывают на то, что сильный иммунноклеточный компонент является прогностическим фактором хорошего ответа на химиотерапию при раке молочной железы, где большое количество опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) связано с повышенными показателями ответа на неоадьювантную терапию. При метастазах в печени колоректального рака сильная инфильтрация CD8⁺ Т-клеток предсказывает лучший ответ на химиотерапию и продолжительное выживание. При меланоме экспрессия иммунной сигнатуры (а именно высокая экспрессия Th1 клеток и связанных с цитотоксичностью генов) коррелирует с хорошим клиническим ответом на терапевтическую вакцину с использованием меланомоассоциированного антигена 3 (MAGEA3) (обзор в публикации Fridman, W.H., et al., The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(12): p. 717-734).

За последние несколько лет накоплено значительное количество доказательств, свидетельствующих о критической роли ОИЛ как для уничтожения опухоли, так и для эффективности иммуноонкологических терапевтических средств. Действительно, основным фактором, связанным с устойчивостью к иммуноонкологическим терапевтическим средствам, является отсутствие инфильтрации опухоли Т-клетками, так называемая ситуация «холодных опухолей». Лечение этих инертных в отношении иммунитета опухолей иммуноонкологическими средствами представляет собой большую проблему, поскольку отсутствует какой-либо адаптивный иммунный ответ против опухоли и реакция на данный вид терапии (Bonaventura, P., et al., Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 168).

Пациентов, у которых никогда не наблюдался клинический ответ или стабилизированное заболевание при блокаде PD-1/PD-L1, называют имеющими

«первичную резистентность» к терапии. Напротив, ранние данные клинических испытаний показали, что наличие предрасполагающих ОИЛ внутри опухоли и на ее периферии, наряду с ко-локализованной экспрессией PD-1 и PD-L1 на Т-клетках и клетках опухолей, соответственно, прогнозирует терапевтический ответ на анти-PD-1 терапию (Nowicki, T.S., S. Hu-Lieskovan, and A. Ribas, Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. *Cancer J*, 2018. **24**(1): p. 47-53). В том же наборе данных, эффективность пембролизумаба (анти-PD-1) коррелирует с наличием внутри опухолей Т-клеток и экспрессией PD-1/PD-L1 как необходимым условием для сильного противоопухолевого ответа (Tumeh, P.C., et al., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 568-71) и эффективности анти-PD-1 средств (Ribas, A., Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2517-9).

Принимая во внимание все эти данные, можно утверждать, что комбинация Омотус с иммуноонкологическими средствами, которая синергически индуцирует Т-клеточную инфильтрацию и стимуляцию, в конечном итоге приведет к улучшению показателей клинического ответа на иммуноонкологические терапевтические средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация, включающая:

i) первый компонент, выбранный из группы, состоящей из:

a) полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта,

b) конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентный вариант и химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта,

c) полинуклеотида, кодирующего полипептид по п. a) или конъюгат по п. b),

d) вектора, содержащего полинуклеотид по п. c), и

e) клетки, способной секретировать в среду полипептид по п. a) или конъюгат по п. b),

и

ii) второй компонент, который представляет собой иммуноонкологическое средство.

2. Комбинация по п. 1, где функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

3. Комбинация по любому из пунктов 1 или 2, где химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида или его функционально эквивалентного варианта, представляет собой последовательность проникающего в клетку пептида, и где указанная последовательность проникающего в клетку пептида и указанный полипептид или его функционально эквивалентный вариант образуют слитый белок.

4. Комбинация по п. 3, где последовательность проникающего в клетку пептида выбрана из группы, состоящей из GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37) и RRRRRRLR (SEQ ID NO: 38).

5. Комбинация по любому из пунктов 1-4, где конъюгат также включает дополнительный сигнал ядерной локализации.

6. Комбинация по любому из пунктов 1-5, с условием, что иммуноонкологическое средство не является цитокином.

7. Комбинация по любому из пунктов 1-6, где иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, или ингибитор иммунных контрольных точек.

8. Комбинация по п. 7, где антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, выбран из анти-PD-1 и анти-CTLA-4.

9. Комбинация по п. 8, где антагонист белка, ингибирующего T-клеточную активацию, представляет собой анти-PD-1.

10. Комбинация по любому из пунктов 8 или 9, где антагонист представляет собой антагонистическое антитело.

11. Комбинация по п. 10, где антагонистическое антитело представляет собой пембролизумаб.

12. Комбинация по любому из пунктов 1-11, где первый компонент представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество комбинации по любому из пунктов 1-12 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

14. Комбинация по любому из пунктов 1-12 или фармацевтическая композиция по п. 13 для применения в медицине.

15. Комбинация по любому из пунктов 1-12 или фармацевтическая композиция по п. 13 для применения в предотвращении и/или лечении рака.

16. Комбинация или фармацевтическая композиция для применения по п. 15, где рак представляет собой рак легких.

17. Комбинация или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 14-16, где композицию вводят системно или интраназально.

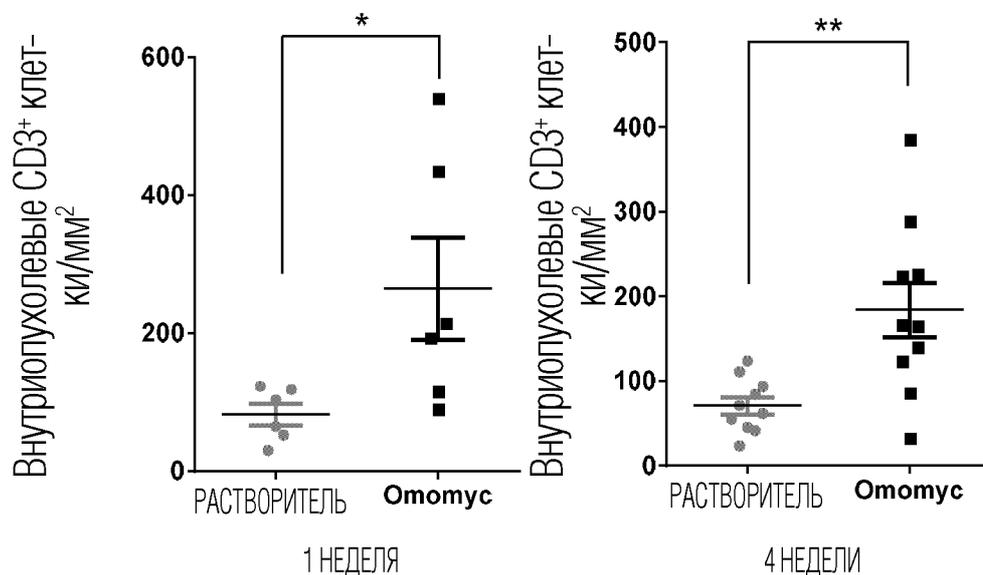
18. Комбинация или фармацевтическая композиция для применения по п. 17, где интраназальное введение выполняют путем инстилляций или назальной ингаляции.

19. Комбинация или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 14-16, где первый компонент вводят интраназально или внутривенно, и второй компонент вводят системно.

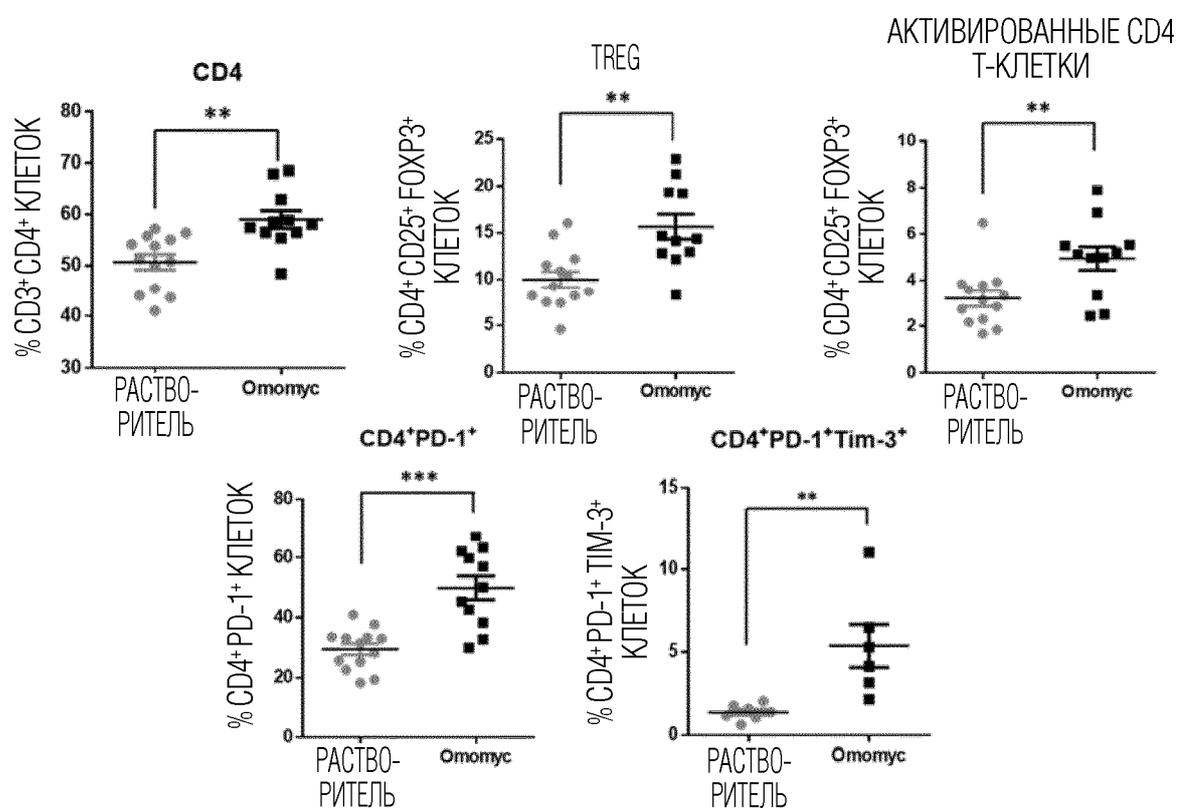
20. Комбинация или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 14-19, где полипептид или его функционально эквивалентный вариант, или конъюгат, синергически взаимодействует с иммуноонкологическим средством в лечении рака.

По доверенности

A

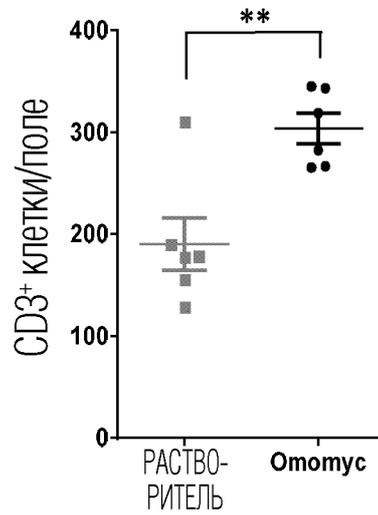


B

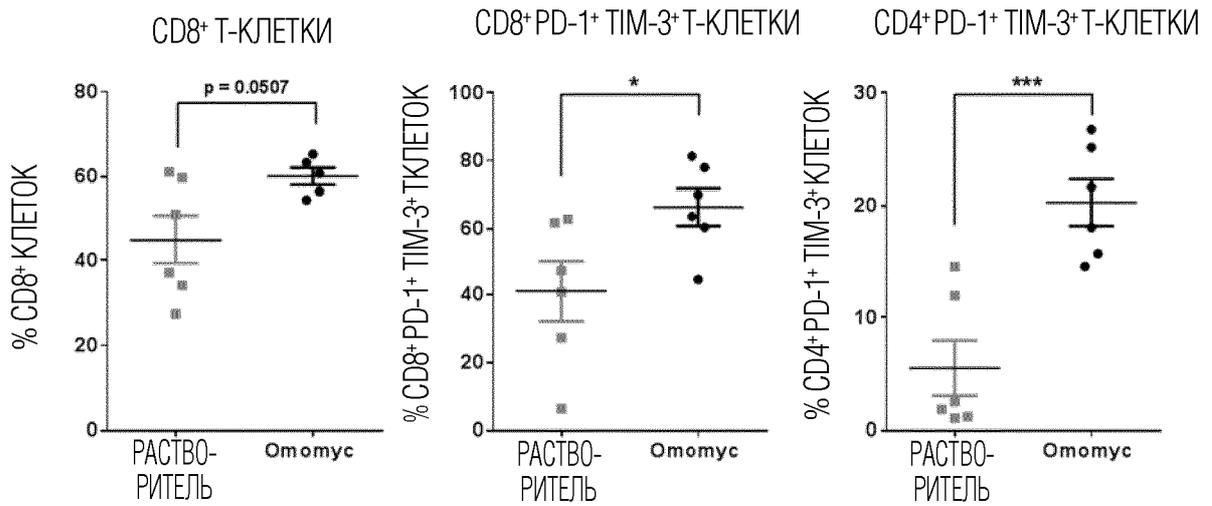


ФИГ. 1

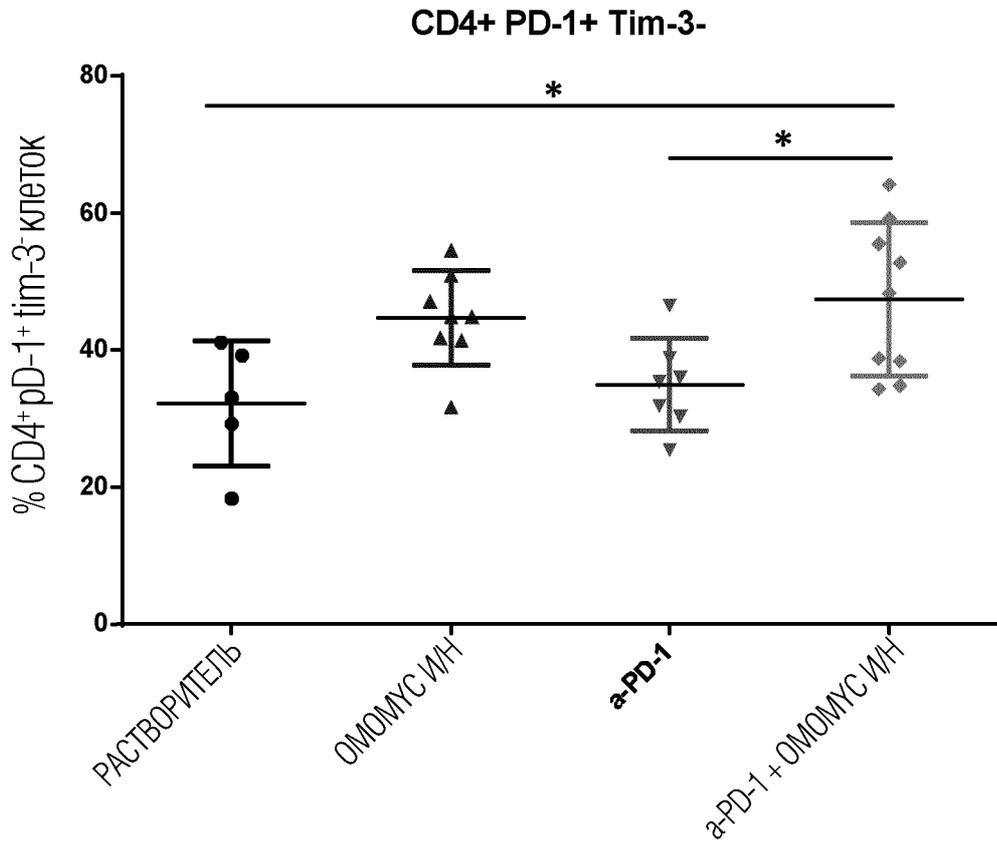
A



B

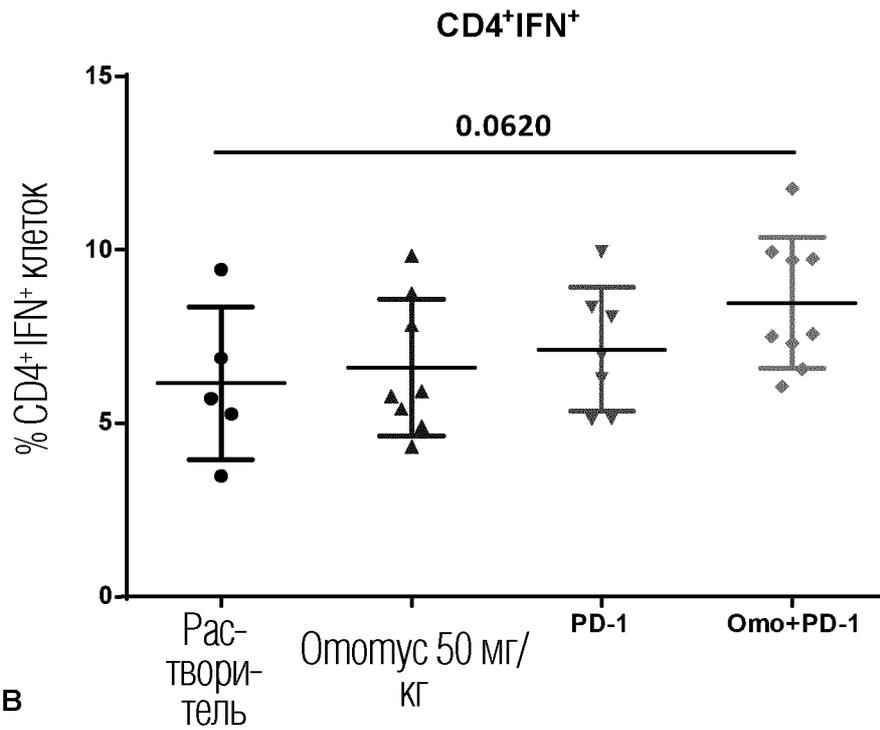


ФИГ. 2

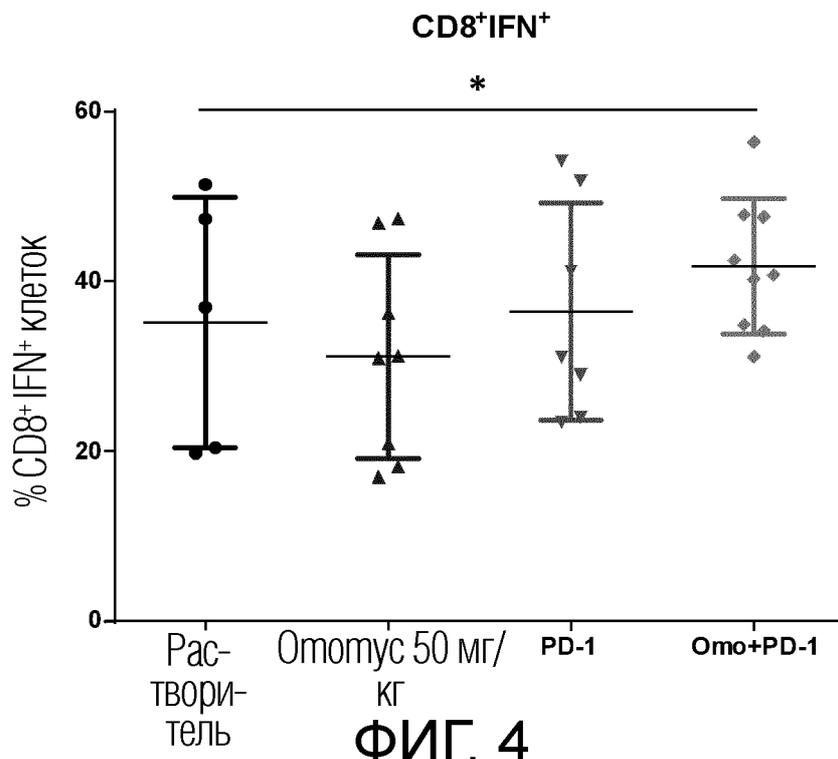


ФИГ. 3

A

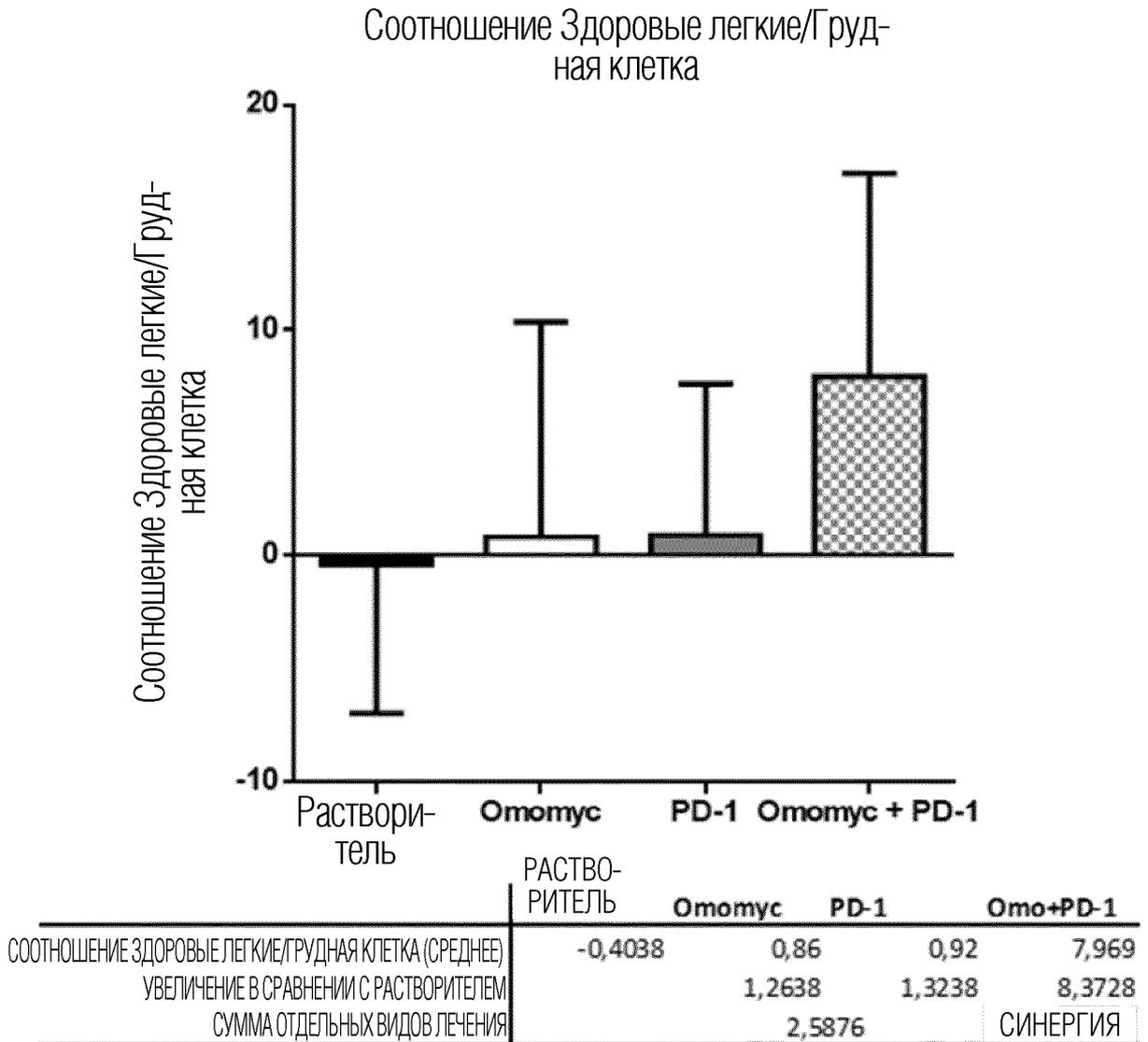


B



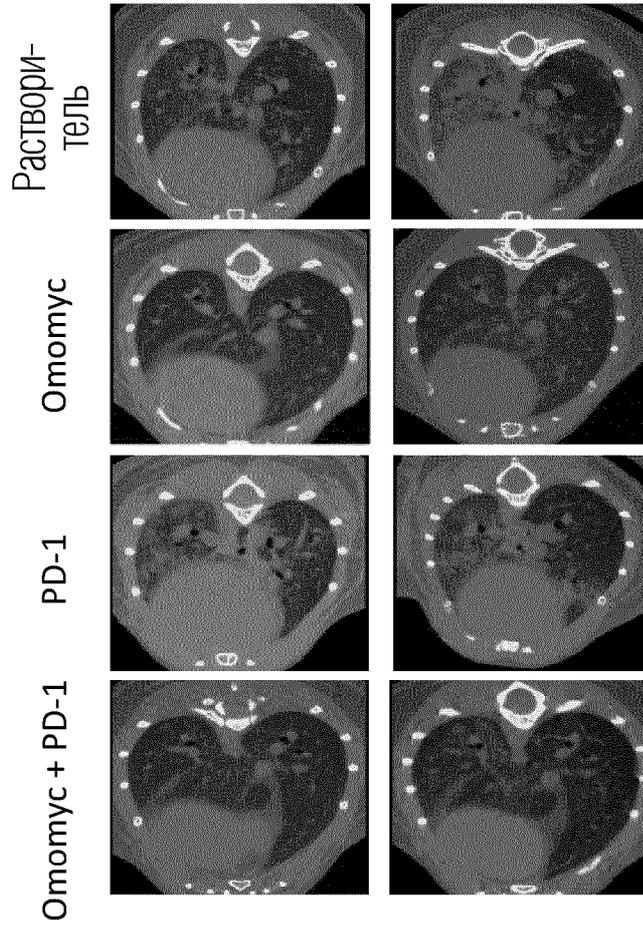
ФИГ. 4

A



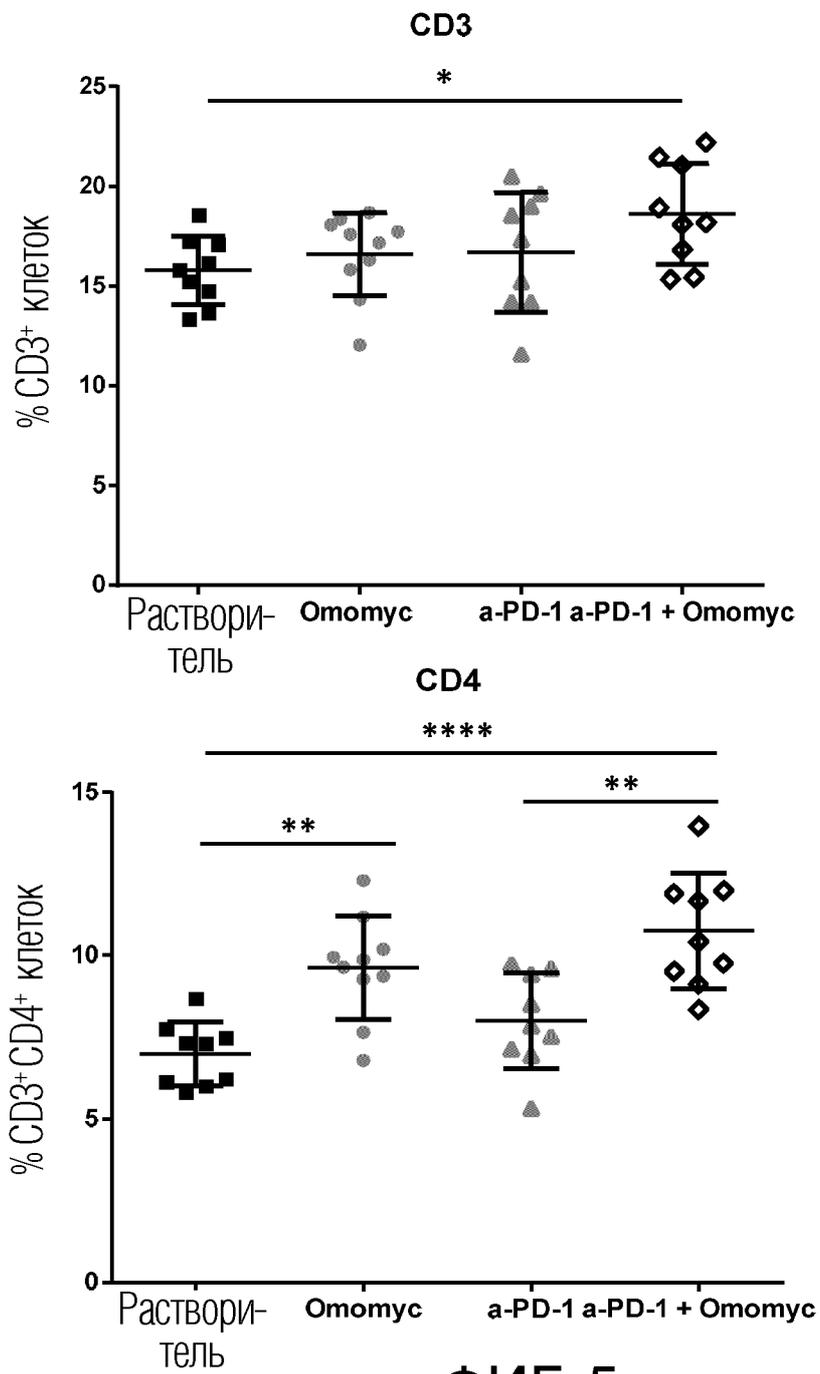
ФИГ. 5

В



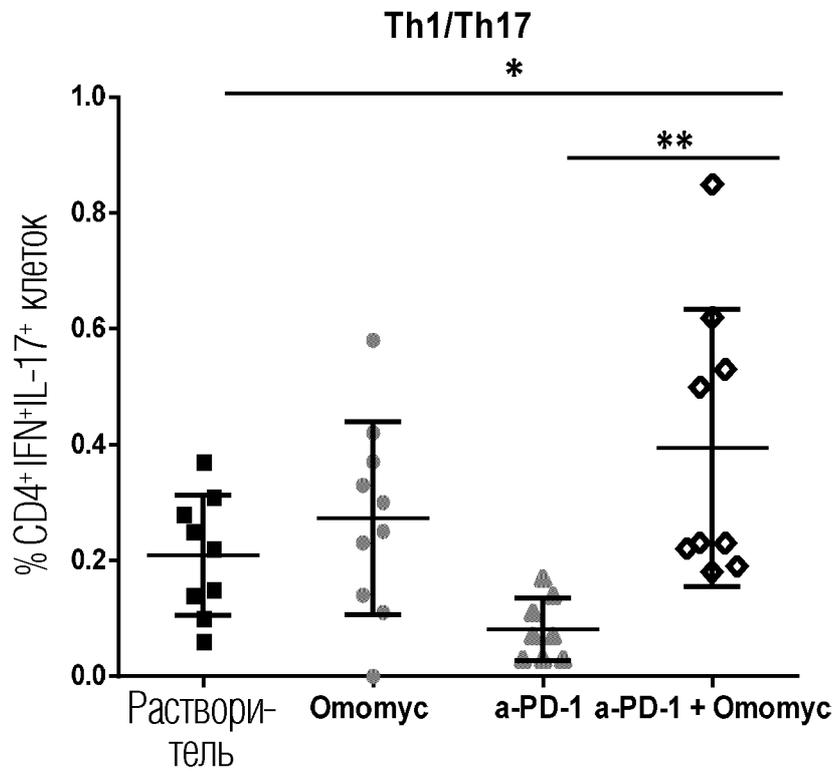
ФИГ. 5

C



ФИГ. 5

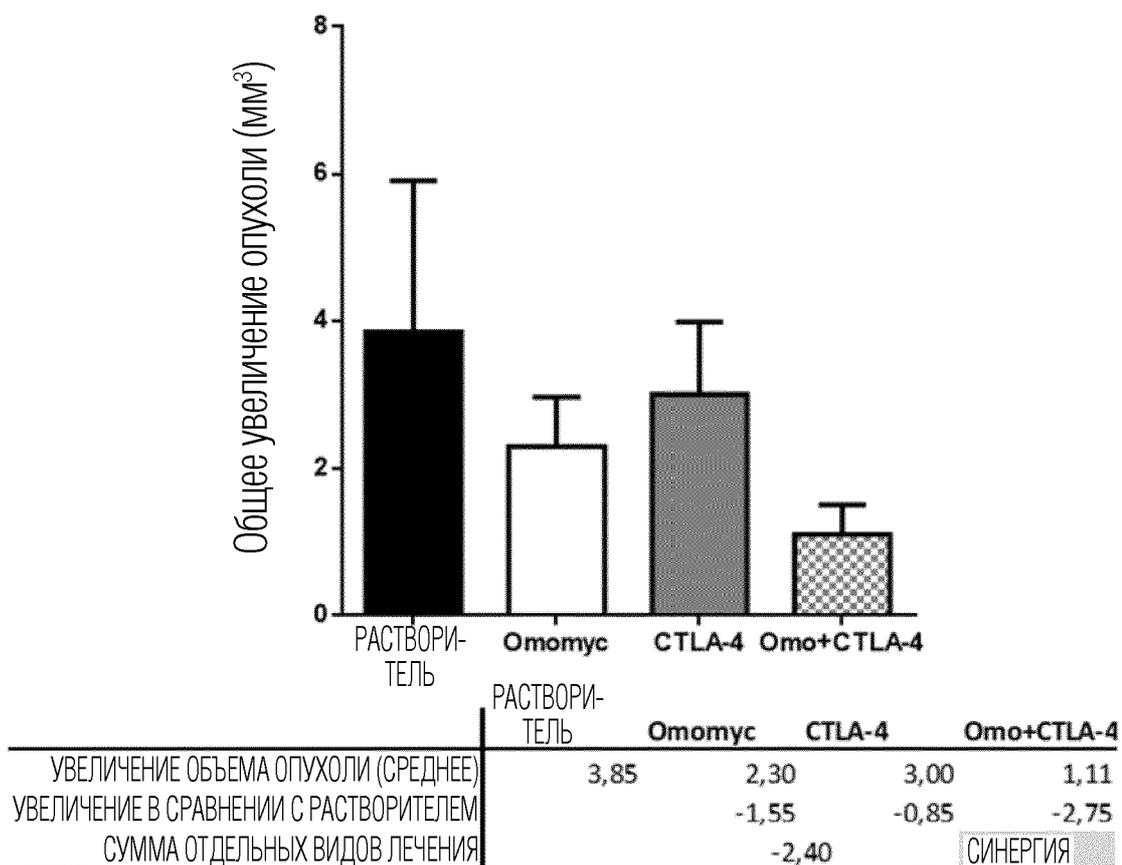
c



ФИГ. 5

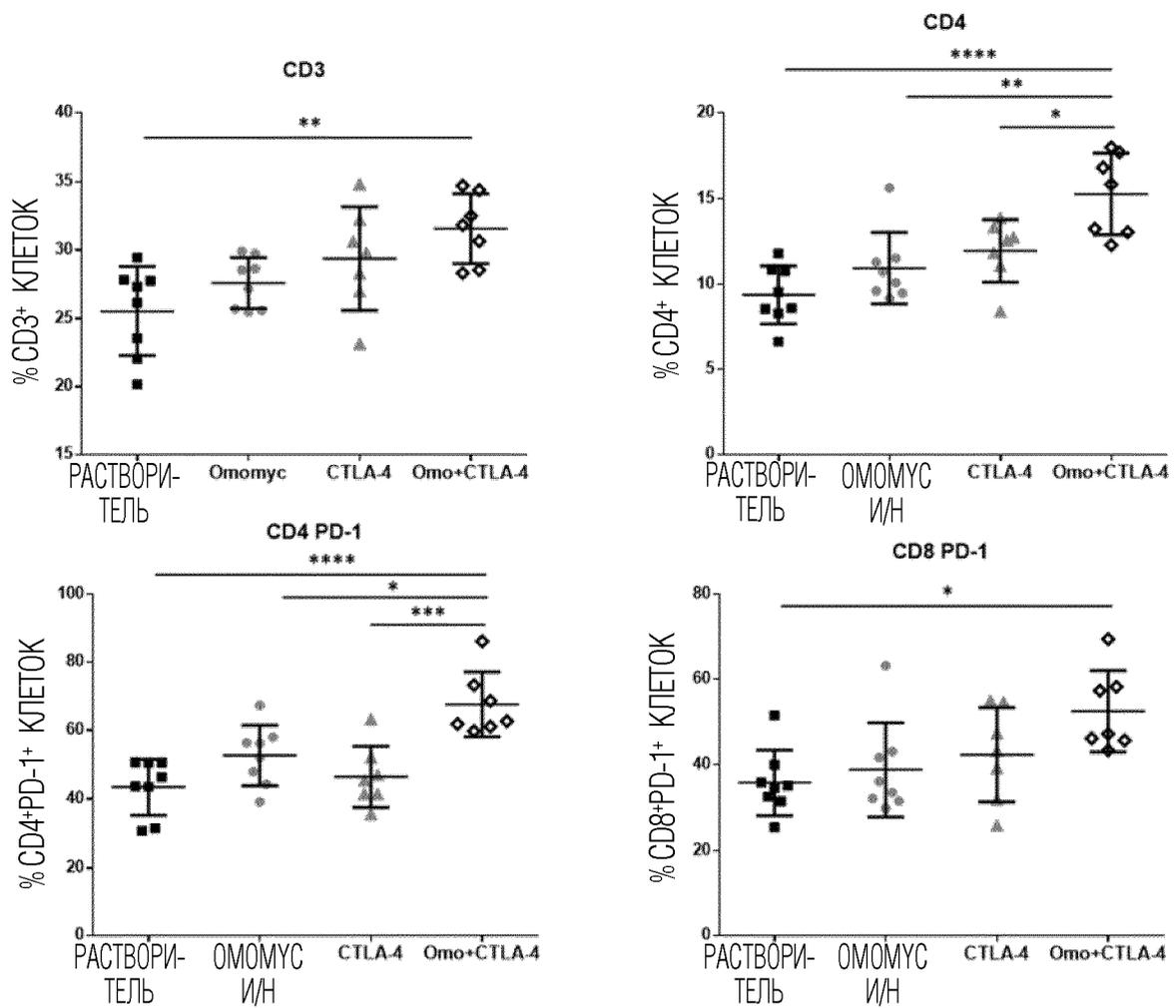
A

Увеличение опухоли

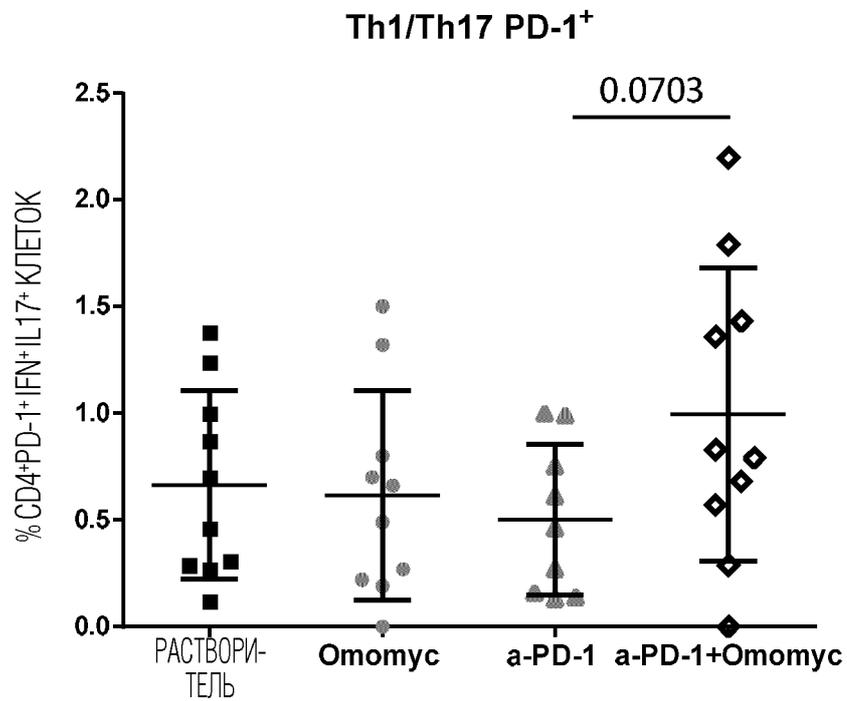
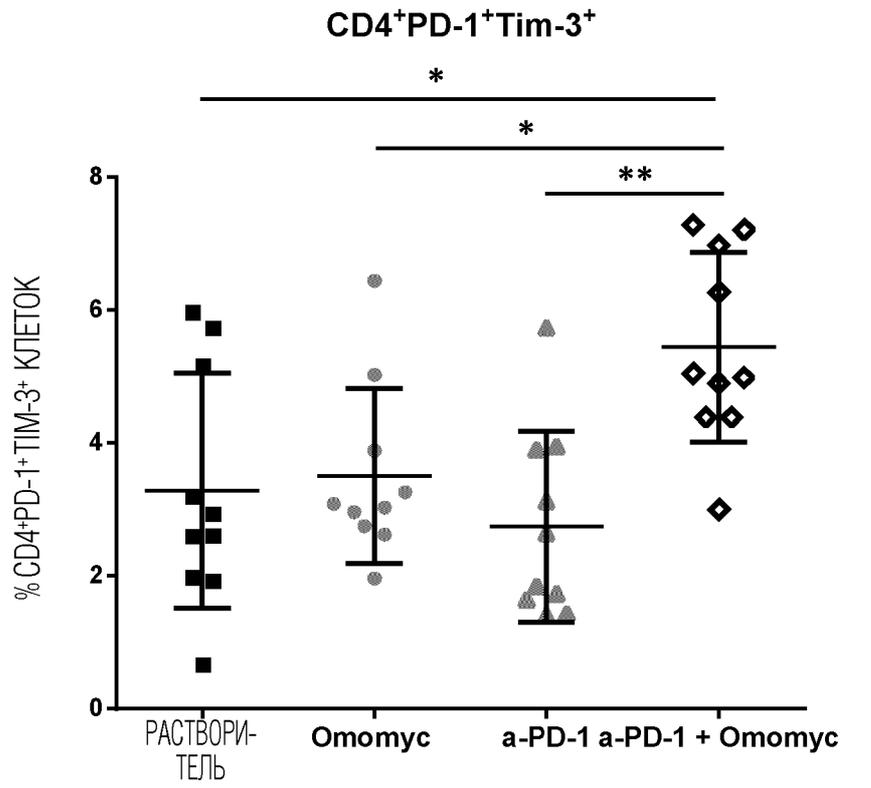


ФИГ. 6

B



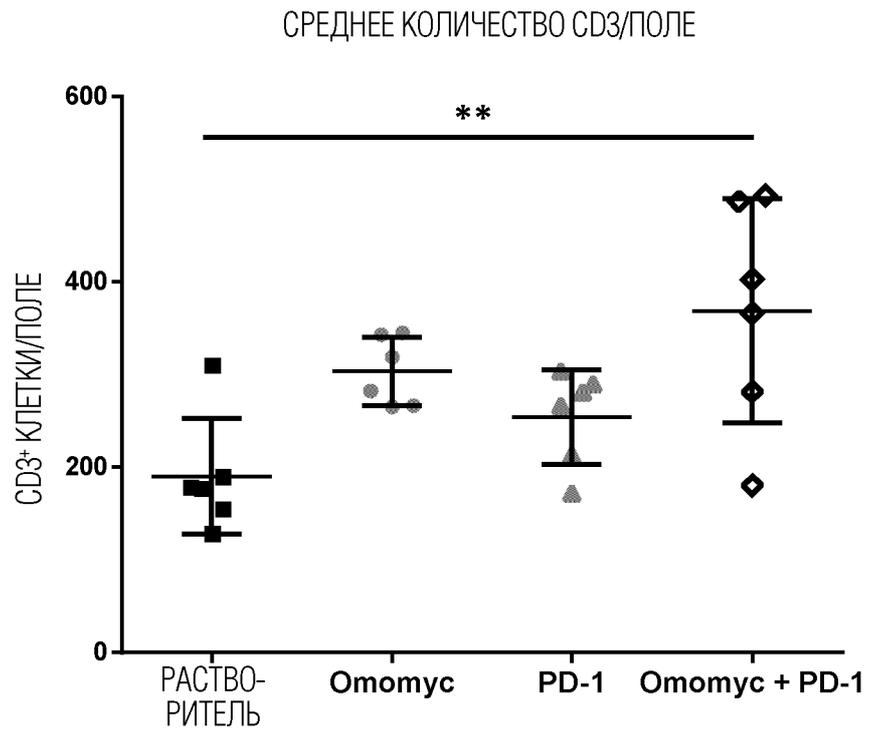
ФИГ. 6



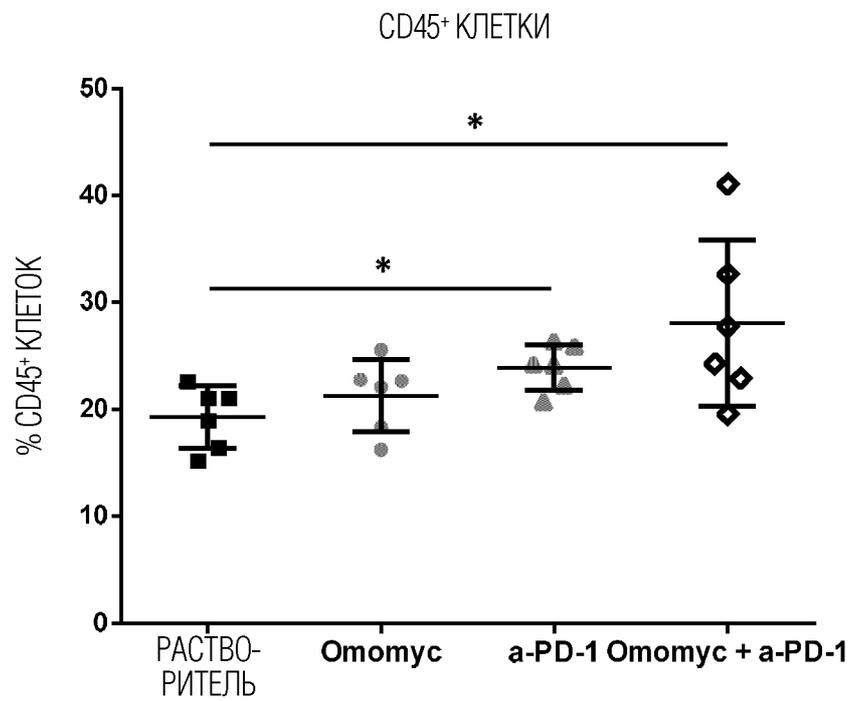
ФИГ. 7

12/16

A

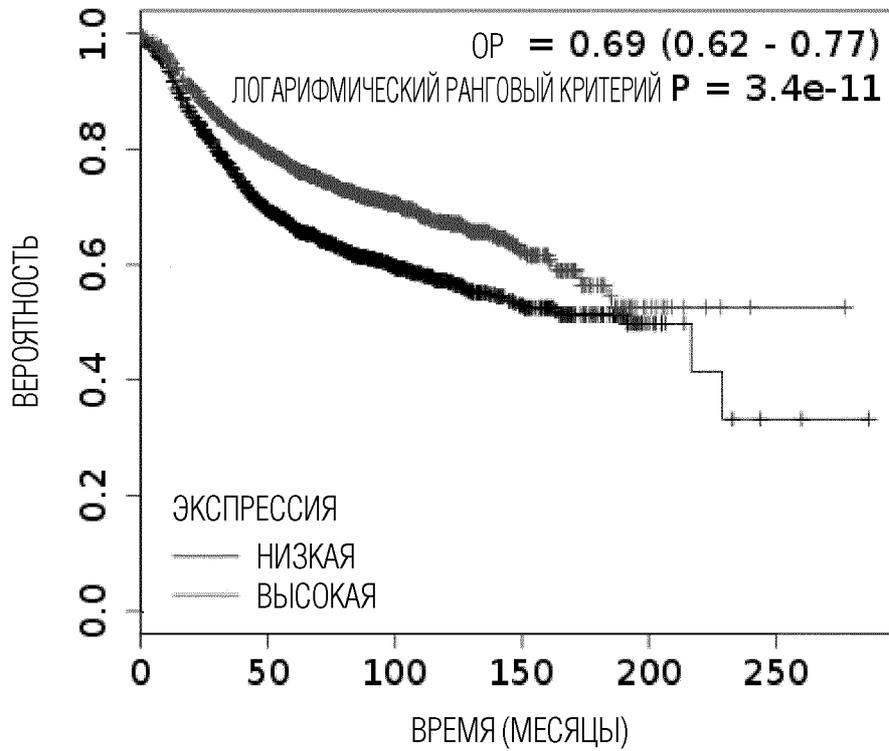


B



ФИГ. 8

CD3E (205456_at)



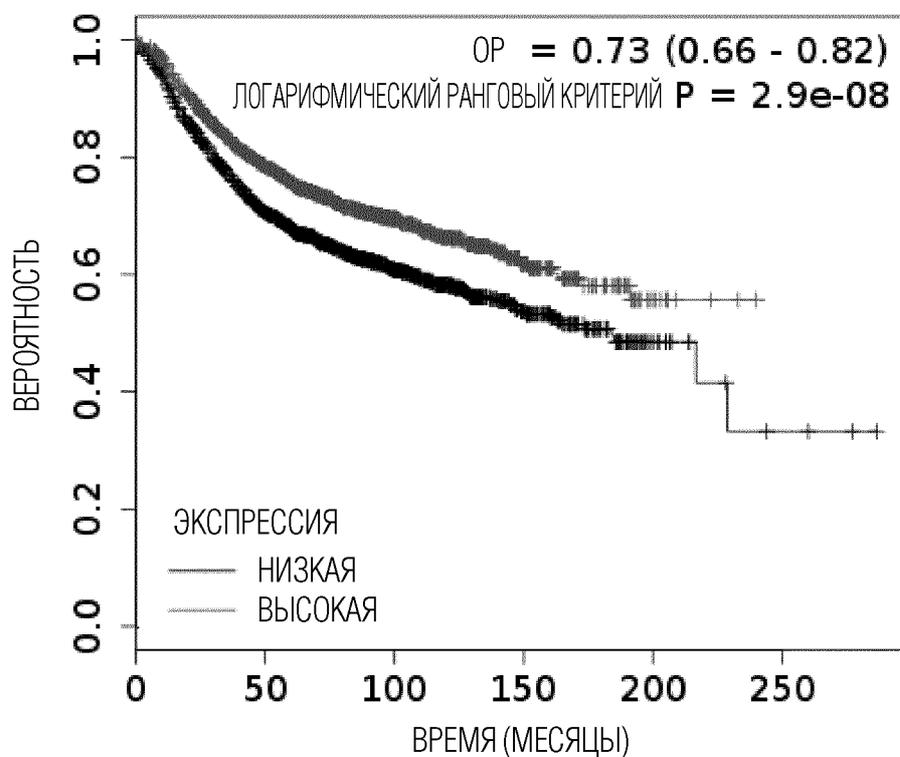
КОЛИЧЕСТВО В ГРУППЕ РИСКА

НИЗКАЯ	1976	1155	469	127	15	2
ВЫСОКАЯ	1975	1364	606	114	12	1

ГРУППА С НИЗКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)	ГРУППА С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)
38	69

ФИГ. 9

CD4 (203547_at)



КОЛИЧЕСТВО В ГРУППЕ РИСКА

НИЗКАЯ	1976	1223	525	134	16	3
ВЫСОКАЯ	1975	1296	550	107	11	0

ГРУППА С НИЗКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)

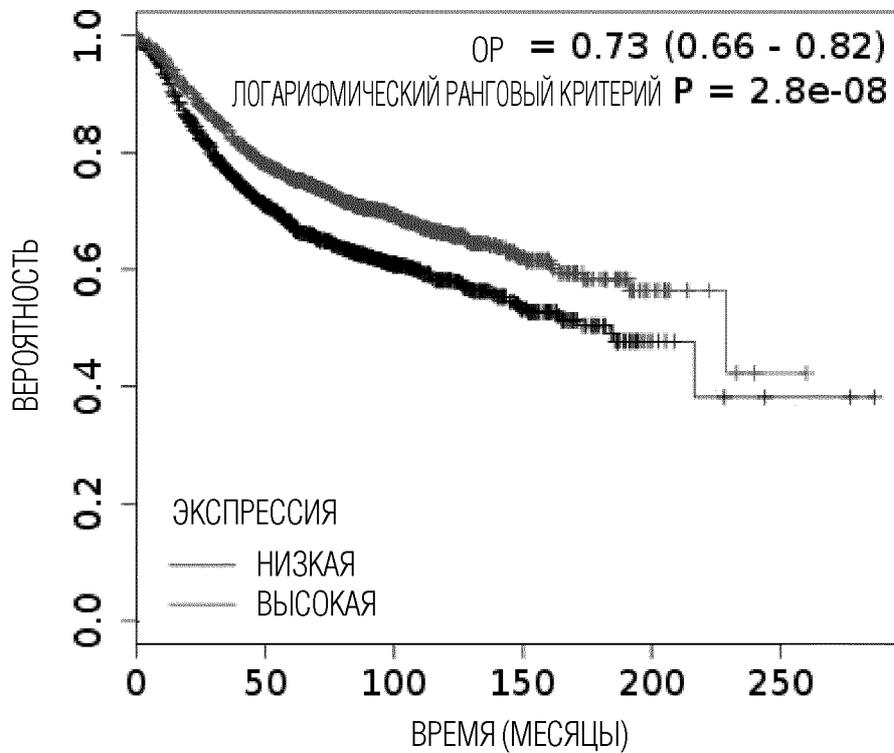
ГРУППА С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)

39,79

62

ФИГ.9 (продолжение)

IL-17A (208402_at)



КОЛИЧЕСТВО В ГРУППЕ РИСКА

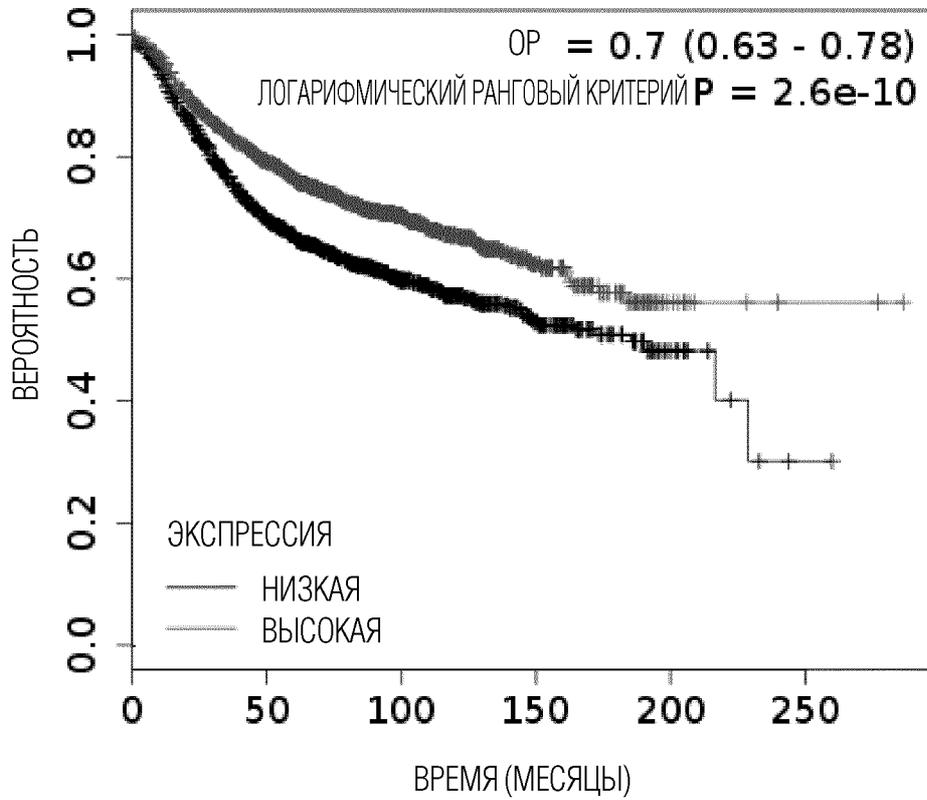
НИЗКАЯ	1982	1186	505	114	10	2
ВЫСОКАЯ	1969	1333	570	127	17	1

ГРУППА С НИЗКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)	ГРУППА С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)
--------------------------------------	---------------------------------------

184,04	228,85
--------	--------

ФИГ.9 (продолжение)

IFNG (210354_at)



КОЛИЧЕСТВО В ГРУППЕ РИСКА

НИЗКАЯ	1988	1163	467	122	17	1
ВЫСОКАЯ	1963	1356	608	119	10	2

ГРУППА С НИЗКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)

ГРУППА С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ (МЕСЯЦЫ)

38,2	66,5
------	------

ФИГ.9 (продолжение)