

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490512** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.05.07**

(51) Int. Cl. *A61K 31/5377* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.08.19**

---

(54) **КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

---

(31) **2021-135138**

(32) **2021.08.20**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2022/031444**

(87) **WO 2023/022235 2023.02.23**

(71) Заявитель:  
**ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,  
ЛТД. (JP)**

(72) Изобретатель:

**Соне Масаюки, Мацуяма Хиронори,  
Тадзуру Кейсукэ, Когуче Йосукэ,  
Акаmine Хироки, Судо Тосики (JP)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение раскрывает введение фармацевтических композиций в комбинации, одна из которых представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую лекарственное средство толинапант, а другая представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

**202490512**  
**A1**

**202490512**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

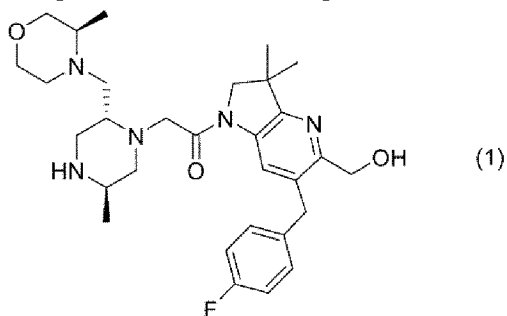
2420-580669EA/081

### КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Область техники

[0001]

Раскрыто соединение, представленное формулой (1):



(толинапант, название IUPAC: 1-[6-[(4-фторфенил)метил]-5-(гидроксиметил)-3,3-диметил-2H-пирроло[3,2-b]пиридин-1-ил]-2-[(2R,5R)-5-метил-2-[[3-(3R)-3-метилморфолин-4-ил]метил]пиперазин-1-ил]этанон), его фармацевтически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват (называемое ниже «лекарственным средством толинапант»); или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированную иммунную клетку; и связанные с ними объекты.

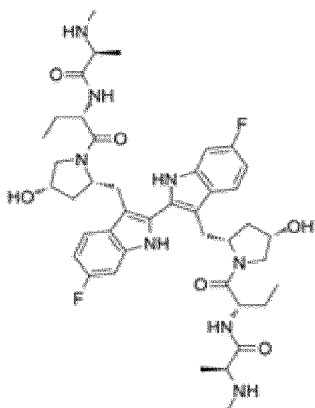
Уровень техники

[0002]

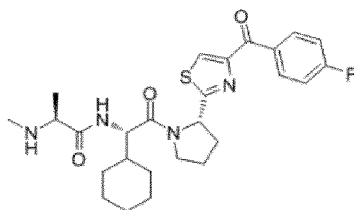
Белки, ингибирующие апоптоз (IAP), сверхэкспрессируются во многих злокачественных опухолях и участвуют, например, в росте опухоли. Семейство IAP включает восемь членов, которые представляют собой XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ILP2, ML-IAP, сурвивин и BRUCE. Члены семейства IAP имеют от 1 до 3 общих копий цинк-координированного домена, состоящего примерно из 70 аминокислот, который называется «домен бакуловирусного повтора IAP (BIR)». Домен BIR связывается с каспазой, такой как каспаза-3, каспаза-7 или каспаза-9, и его функцией является ингибирование апоптоза.

[0003]

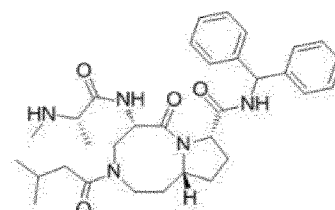
Антагонисты IAP ингибируют связывание каспаз с доменом BIR и индуцируют апоптоз для лечения опухолей. В качестве антагонистов IAP известны непептидные миметические низкомолекулярные антагонисты, такие как толинапант (ASTX660) (см., например, Патентную литературу (PTL) 1) и имитаторы второго митохондриального активатора каспаз (SMAC), такие как биринапант, LCL161 и AT406.



Виллинапант



LCL161



Зебинапант (AT406)

[0004]

Другой известный подход к лечению опухоли представляет собой адоптивную иммунотерапию с использованием генетически модифицированных иммунных клеток.

[0005]

Например, известен способ, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, в Т-клетки, собранные из живого организма, выращивание полученных Т-клеток *in vitro* и инфузию полученных Т-клеток (см., например, Патентную литературу (PTL) 2). Химерный антигенный рецептор первого поколения состоит из одноцепочечного антитела, способного распознавать поверхностный антиген опухолевых клеток, трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена комплекса TCR CD3 $\zeta$ , который активирует Т-клетки. С целью усиления Т-клеточной активации химерного антигенного рецептора первого поколения, был разработан химерный антигенный рецептор второго поколения, с которым связан внутриклеточный сигнальный домен CD28, который является костимулирующей молекулой Т-клеток. Кроме того, также был разработан химерный антигенный рецептор третьего поколения, с которым связан в тандеме внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD137 (4-1BB) или CD134 (OX40), которые представляют собой надсемейство рецепторов фактора некроза опухоли (TNF).

[0006]

Кроме того, известен также способ, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, способный распознавать специфический антиген, в Т-клетки, собранные из живого организма, и выращивание полученных Т-клеток *in vitro*, а также инфузию полученных Т-клеток. В качестве нуклеиновых кислот, кодирующих Т-клеточные рецепторы, известны, например, гены TCR, таргетирующие опухолевые антигены, такие как gp100, MART-1, CEA, MAGE-A4, WT1 и NY-ESO-1.

Список цитирования

Патентная литература

[0007]

PTL 1: WO2015/092420

PTL 2: WO1993/019163

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0008]

Целью настоящего изобретения является улучшение терапевтических эффектов генно-модифицированной иммунотерапии.

Решение проблемы

[0009]

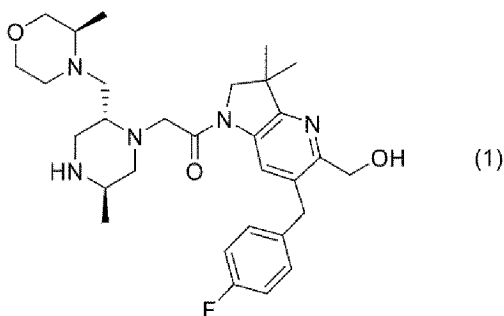
Авторы настоящего изобретения провели обширные исследования для достижения вышеуказанной цели. В результате, изобретатели обнаружили, что когда фармацевтическую композицию, содержащую лекарственное средство толиапант, вводят в комбинации с модифицированной иммунной клеткой, или когда фармацевтическую композицию, содержащую модифицированную иммунную клетку, вводят в комбинации с лекарственным средством толиапант, эффективность значительно увеличивается и достигается синергетический эффект.

[0010]

Настоящее изобретение обычно включает следующее.

Пункт 1.

Фармацевтическая композиция (или лекарственное средство, медикамент или ингибитор IAP), содержащая соединение, представленное формулой (1):



его фармацевтически приемлемая соль, или его фармацевтически приемлемый сольват, где фармацевтическую композицию вводят комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

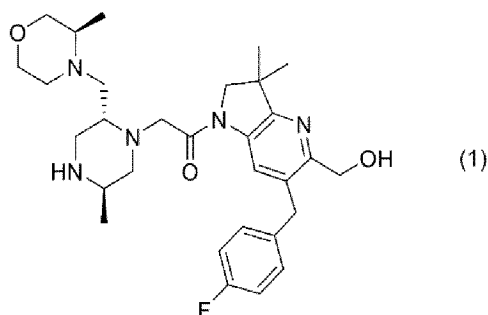
Пункт 1a.

Фармацевтическая композиция (или лекарственное средство, медикамент или ингибитор IAP) по пункту 1, которую вводят до, одновременно или после введения иммунной клетки.

Пункт 2.

Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора, где фармацевтическую композицию вводят в

комбинации с соединением, представленным следующей формулой (1):



его фармакологически приемлемой солью, или его фармакологически приемлемым сольватом.

Пункт 2а.

Фармацевтическая композиция по пункту 2, которую вводят до, одновременно или после введения соединения, представленного формулой (1), его фармацевтически приемлемой соли или его фармацевтически приемлемого сольвата.

Пункт 3.

Фармацевтическая композиция по пункту 1 или 2 или пункту 1а или 2а, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрина  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 4.

Фармацевтическая композиция по пункту 1 или 2 или пункту 1а или 2а, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 5.

Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-4, 1а и 2а, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и

химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 6.

Фармацевтическая композиция по пункту 5, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 7.

Фармацевтическая композиция по пункту 5 или 6, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 8.

Фармацевтическая лекарственная композиция по любому из пунктов 5-7, где

костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 9.

Фармацевтическая композиция по пункту 1 или 2 или пункту 1а или 2а, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный узнавать NY-ESO-1.

Пункт 10.

Фармацевтическая композиция по пункту 1 или 2 или пункту 1а или 2а, где иммунная клетка представляет собой

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta 7$ ,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 11.

Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-10, 1а и 2а для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 12.

Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-11, 1а и 2а, где соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль или его фармацевтически приемлемый сольват вводят в дозе от 10 до 180 мг/день.

Пункт 12а.

Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-11, 1а и 2а, где соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль или его фармацевтически приемлемый сольват вводят в дозе ниже, чем доза, вводимая при отдельном введении, или в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 13.

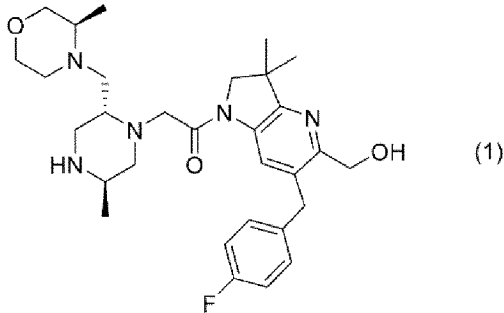
Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-12, 1а, 2а и 12а, где иммунную клетку вводят в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день.

Пункт 13а.

Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-12, 1а, 2а и 12а, где иммунную клетку вводят в дозе, меньшей, чем доза при отдельном введении, или в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 14.

Набор, содержащий первый агент и второй агент,  
где первый агент содержит  
соединение, представленное формулой (1):



его фармакологически приемлемую соль, или  
его фармацевтически приемлемый сольват, и  
второй агент содержит иммунную клетку, модифицированную для экспрессии  
химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

Пункт 14a.

Набор по пункту 14, где первый агент и второй агент находятся в одном и том же  
составе и вводятся одновременно, или первый агент и второй агент находятся в разных  
составах и вводятся одновременно, отдельно или последовательно.

Пункт 14b.

Набор по пункту 14 или 14a, где химерный антигенный рецептор или  
рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из  
группы, состоящей из CD19, интегрина  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 14c.

Набор по пункту 14 или 14a, где химерный антигенный рецептор или  
рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный  
интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 14d.

Набор по любому из пунктов 14 и 14a-14c, где иммунная клетка представляет  
собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного  
антигенного рецептора, и химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 14e.

Набор по пункту 14d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или  
интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 14f.

Набор по пункту 14d или 14e, где трансмембранный домен представляет собой

трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 14g.

Набор по любому из пунктов 14d-14f, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 14h.

Набор по пункту 14 или 14a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора; и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 14i.

Набор по пункту 14 или 14a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta$ 7,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 14j.

Набор по любому из пунктов 14 и 14a-14i, который предназначен для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 14k.

Набор по любому из пунктов 14 и 14a-14j, где соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль или его фармацевтически приемлемый сольват вводят в дозе от 10 до 180 мг/день, в дозе ниже, чем доза при отдельном введении, или в количестве, неэффективном при отдельном введении.

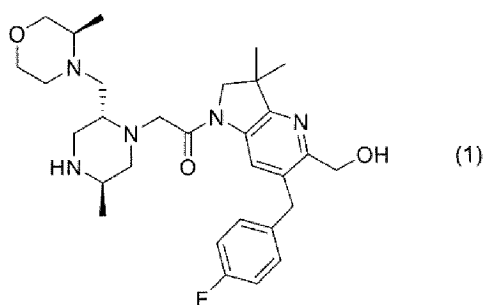
Пункт 14L.

Набор по любому из пунктов 14 и 14a-14k, где иммунные клетки вводят в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день, в дозе ниже, чем доза при отдельном введении, или в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 15.

Способ профилактики и/или лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в профилактике и/или лечении рака соединения, представленного формулой (1):





его фармакологически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемого сольвата, в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

Пункт 15а.

Способ по пункту 15, где введение осуществляют путем введения соединения, представленного формулой (1), его фармакологически приемлемой соли или его фармацевтически приемлемого сольвата до, одновременно или после введения иммунных клеток.

Пункт 15b.

Способ по пункту 15 или 15а, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрина  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 15с.

Способ по пункту 15 или 15а, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 15d.

Способ по любому из пунктов 15 и 15а-15с, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и

химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 15е.

Способ по пункту 15d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 15f.

Способ по пункту 15d или 15е, где трансмембранный домен представляет собой CD28 или CD8.

Пункт 15g.

Способ по любому из пунктов 15d-15f, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 15h.

Способ по пункту 15 или 15a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 15i.

Способ по пункту 15 или 15a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, способного специфически распознавать CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta$ 7,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 15j.

Способ по любому из пунктов 15 и 15a-15i, где соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль, или его фармацевтически приемлемый сольват вводят

в дозе от 10 до 180 мг/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 15k.

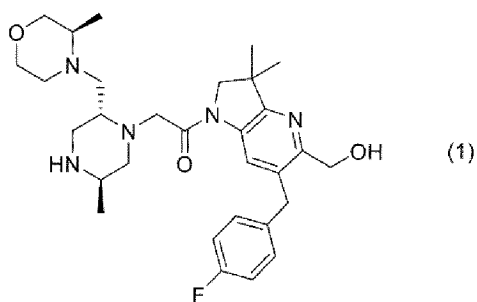
Способ по любому из пунктов 15 и 15a-15j, где иммунную клетку вводят в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 16.

Применение соединения, представленного формулой (1)



его фармакологически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемого сольвата при приготовлении лекарственного средства для введения в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

Пункт 16a.

Применение по пункту 16, где лекарственное средство вводят до, одновременно или после введения иммунных клеток.

Пункт 16b.

Применение по пункту 16 или 16a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрин  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 16c.

Применение по пункту 16 или 16a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 16d.

Применение по любому из пунктов 16 и 16a-16c, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и

химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 16e.

Применение по пункту 16d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 16f.

Применение по пункту 16d или 16e, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 16g.

Применение по любому из пунктов 16d-16f, где костимулирующая молекула

представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 16h.

Применение по пункту 16 или 16a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 16i.

Применение по пункту 16 или 16a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta$ 7,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 16j.

Применение по любому из пунктов 16 и 16a-16i, где лекарственное средство предназначено для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 16k.

Применение по любому из пунктов 16 и 16a-16j, где лекарственное средство предназначено для применения при введении

соединения, представленного формулой (1),

его фармацевтически приемлемой соли, или

его фармацевтически приемлемого сольвата,

в дозе от 10 до 180 мг/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 16L.

Применение по любому из пунктов 16 и 16a-16k, где лекарственное средство предназначено для применения при введении в комбинации с иммунной клеткой

в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день,

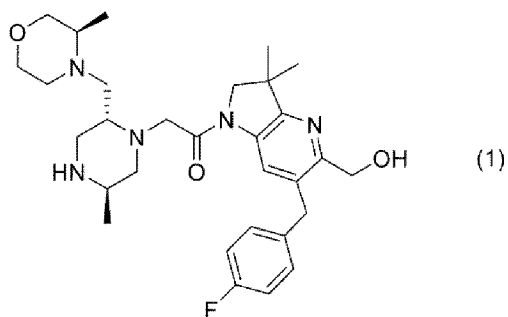
в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 17.

Применение иммунной клетки, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора, при приготовлении

лекарственного средства для введения в комбинации с соединением, представленным формулой (1):



его фармакологически приемлемой солью, или его фармацевтически приемлемым сольватом.

Пункт 17a.

Применение по пункту 17, где лекарственное средство предназначено для введения до, одновременно или после введения

соединения, представленного формулой (1), его фармакологически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемого сольвата.

Пункт 17b.

Применение по пункту 17 или 17a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный T-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрин бета7 и NY-ESO-1.

Пункт 17c.

Применение по пункту 17 или 17a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный T-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 17d.

Применение по пункту 17 и 17a-17c, где иммунная клетка представляет собой T-клетку или NK-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и

химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 17e.

Применение по пункту 17d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 17f.

Применение по пункту 17d или 17e, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 17g.

Применение по любому из пунктов 17d-17f, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 17h.

Применение по пункту 17 или 17a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 17i.

Применение по пункту 17 или 17a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta$ 7,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 17j.

Применение по любому из пунктов 17 и 17a-17i, где лекарственное средство предназначено для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 17k.

Применение по любому из пунктов 17 и 17a-17j, где лекарственное средство предназначено для введения в иммунную клетку.

в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 17L.

Применение по любому из пунктов 17 и 17a-17k, где лекарственное средство предназначено для применения при введении в комбинации с

соединением, представленным формулой (1),

его фармакологически приемлемой солью, или

его фармацевтически приемлемым сольватом

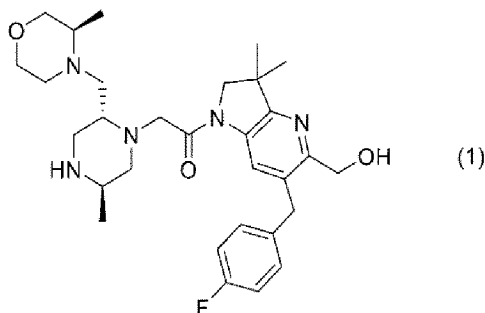
в дозе от 10 до 180 мг/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или

в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 18.

Соединение, представленное формулой (1):



его фармакологически приемлемая соль, или

его фармацевтически приемлемый сольват,

где соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват предназначены для применения при введении в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

Пункт 18a.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по пункту 18,

где соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват предназначены для применения при введении до, одновременно или после введения в иммунную клетку.

Пункт 18b.

Применение по пункту 18 или 18a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрина  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 18c.

Применение по пункту 18 или 18a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 18d.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по любому из пунктов 18 и 18a-18c, где

иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или НК-клеток, и

химерный антигенный рецептор содержит

(1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,

(2) трансмембранный домен,

(3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы и

(4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 18e.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически

приемлемый сольват по пункту 18d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 18f.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по пункту 18d или 18e, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 18g.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по любому из пунктов 18d-18f, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 18h.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по пункту 18 или 18a, где

иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора или НК-клеток; и

рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 18i.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по пункту 18 или 18a, где иммунная клетка представляет собой

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, способного специфически распознавать CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, способного специфически распознавать интегрин  $\beta 7$ ,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, способного специфически распознавать CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, способного специфически распознавать NY-ESO-1.

Пункт 18j.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по любому из пунктов 18 и 18a-18i, где соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват предназначены для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 18k.

Соединение по любому из пунктов 18 и 18a-18j, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват, где соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват предназначены для применения при введении

в дозе от 10 до 180 мг/день,



в дозе ниже дозы при отдельном введении, или  
в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 18L.

Соединение, его фармакологически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемый сольват по любому из пунктов 18 и 18a-18k, которые предназначены для применения при введении в комбинации с иммунной клеткой

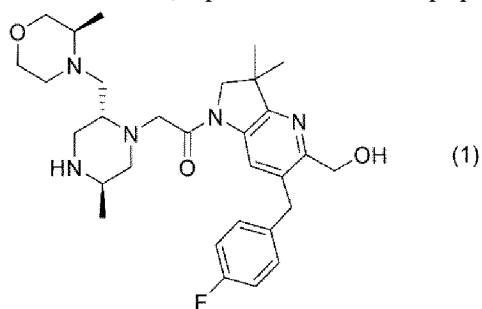
в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или  
в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 19.

Иммунная клетка, модифицированная для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора, где иммунная клетка предназначена для применения при введении в комбинации с

соединением, представленным формулой (1):



его фармакологически приемлемой солью, или  
его фармацевтически приемлемым сольватом.

Пункт 19a.

Иммунная клетка по пункту 19, которая предназначена для применения до,  
одновременно или после введения

соединения, представленного формулой (1),  
его фармацевтически приемлемой соли, или  
его фармацевтически приемлемого сольвата.

Пункт 19b.

Иммунная клетка по пункту 19 или 19a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрин  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

Пункт 19c.

Иммунная клетка по пункту 19 или 19a, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 19d.

Иммунная клетка по любому из пунктов 19 и 19a-19c, где

иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и

химерный антигенный рецептор содержит

- (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,
- (2) трансмембранный домен,
- (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
- (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Пункт 19e.

Иммунная клетка по пункту 19d, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta 7$ .

Пункт 19f.

Иммунные клетки по пункту 19d или 19e, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

Пункт 19g.

Иммунная клетка по пунктам 19d или 19f, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).

Пункт 19h.

Иммунная клетка по пункту 19 или 19a, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет варибельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.

Пункт 19i.

Иммунная клетка по пункту 19 или 19i, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,

Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta 7$ ,

НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или

Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.

Пункт 19j.

Иммунная клетка по любому из пунктов 19 и 19a-19i, предназначенная для применения в профилактике и/или лечении рака.

Пункт 19k.

Иммунная клетка по любому из пунктов 19 и 19a-19j, предназначенная для применения при введении

в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы

тела/день,

в дозе ниже дозы при отдельном введении, или  
в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Пункт 19L.

Иммунная клетка по любому из пунктов 19 и 19a-19k, которая предназначена для применения при введении в комбинации с

соединением, представленным формулой (1),  
его фармакологически приемлемой солью, или  
его фармацевтически приемлемым сольватом,  
в дозе от 10 до 180 мг/день,  
в дозе ниже дозы при отдельном введении, или  
в количестве, неэффективном при отдельном введении.

Полезные эффекты изобретения

[0011]

Настоящее изобретение может значительно повысить эффективность фармацевтической композиции, содержащей лекарственное средство толипапант или модифицированную иммунную клетку.

Краткое описание чертежей

[0012]

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект биринапанта и CD19 CAR-T.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект толипапанта (на фигуре толипапант означает (+)-L-лактат соединения, представленного формулой (1)) и CD19 CAR-T. Звездочка (\*) указывает на то, что был протестирован комбинированный эффект в односторонней модели, и комбинация толипапанта и CD19 CAR-T ( $1 \times 10^5$  клеток/организм) продемонстрировала значительно улучшенный эффект ( $p < 0,05$ ) по сравнению с эффектом, достигаемым контролем (при использовании только толипапанта или только CD19 CAR-T ( $1 \times 10^5$  клеток/организм)).

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект толипапанта (на фигуре «толипапант» означает (+)-L-лактат соединения, представленного формулой (1)) и CD19 CAR-T на опухоль небольшого объема.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект LCL161 и CD19 CAR-T.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект AT406 и CD19 CAR-T.

Фиг. 6 представляет собой диаграмму, показывающую схему введения.

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект толипапанта и активированного интегрин  $\beta 7$  CAR-T.

Фиг. 8 представляет собой диаграмму, показывающую схему введения.

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий комбинированный эффект

толинапанта и CD19 CAR-KHYG-1.

Фиг. 10 представляет собой диаграмму, показывающую схему введения.

Описание вариантов осуществления

[0013]

А. Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственное средство толинапанта

Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственное средство толинапанта по настоящему изобретению (называемая ниже «фармацевтической композицией А»), предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию для введения в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора (которая может быть в форме фармацевтической композиции В, описанной ниже). В частности, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию, которую вводят до, одновременно или после введения иммунной клетки. Фармацевтическая композиция А обычно может представлять собой антагонист IAP и, в частности, может быть антагонистом XIAP, sIAP1 или sIAP2. По сравнению, например, с другими антагонистами IAP, лекарственные средства толинапанта могут быстрее демонстрировать эффективность при введении в комбинации с модифицированными иммунными клетками.

[0014]

А-1. Лекарственное средство толинапанта

Соединение, представленное формулой (1), может присутствовать в виде одного оптического изомера в количестве 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более, 99,5% или более, 99,9% или более или 100%, в зависимости от общей суммы.

[0015]

Фармацевтически приемлемая соль соединения, представленного формулой (1), предпочтительно представляет собой кислотно-аддитивную соль. Кислотно-аддитивная соль может представлять собой аддитивную соль органической кислоты или аддитивную соль неорганической кислоты. Примеры кислотно-аддитивных солей включают, но не ограничены ими, уксусную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, адипиновую кислоту, альгиновую кислоту, аскорбиновую кислоту (например, L-аскорбиновую кислоту), L-аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, бутановую кислоту, (+)-камфорную кислоту, камфорсульфоновую кислоту, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновую кислоту, каприновую кислоту, капроновую кислоту, каприловую кислоту, кремниевую кислоту, лимонную кислоту, цикламиную кислоту, додецилсульфат, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, глюкогептоновую кислоту, D-глюконовую кислоту, глюкуроновую кислоту (например, D-глюкуроновую

кислоту), глутаминовую кислоту (например, L-глутаминовую кислоту),  $\alpha$ -оксоглутаровую кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, гидрогалогенированные кислоты (например, бромистоводородную кислоту, хлористоводородную кислоту и иодистоводородную кислоту), изетионовую кислоту, молочную кислоту (например, (+)-L-молочную кислоту, (-)-D-молочную кислоту, ( $\pm$ )-DL-молочную кислоту), лактобионовую кислоту, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, (-)-L-яблочную кислоту, малоновую кислоту, ( $\pm$ )-DL-миндальную кислоту, метансульфовую кислоту, нафталин-2-сульфовую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, оротовую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, памовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, пировиноградную кислоту, L-пироглутаминовую кислоту, салициловую кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, дубильную кислоту, (+)-L-винную кислоту, тиоциановую кислоту, п-толуолсульфовую кислоту, ундециленовую кислоту, валериановую кислоту и ацилированную аминокислоту. В одном варианте осуществления фармакологически приемлемая соль соединения, представленного формулой (1), предпочтительно, представляет собой лактат (например, (+)-L-молочную кислоту), гидрохлорид (включая дигидрохлорид), сульфат или мезилат.

[0016]

Примеры фармакологически приемлемого сольвата включают, но не ограничены ими, воду, метанол, этанол, изопропанол, уксусную кислоту, этилацетат, этаноламин и диметилсульфоксид (ДМСО).

[0017]

#### A-2. Другие компоненты

Фармацевтическая композиция А предпочтительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент в качестве другого компонента. Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают носители (включая твердые носители, полутвердые носители и жидкие носители), вспомогательные агенты, разбавители, наполнители или объемообразующие агенты, гранулы, агенты для покрытия, агенты контроля высвобождения, связующие агенты, разрыхлители, смазывающие агенты, консерванты, антиоксиданты, буферы, агенты, препятствующие осаждению, загустители, ароматизаторы, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, хелатирующие агенты и другие эксципиенты, обычно используемые в фармацевтических композициях. Такие фармацевтически приемлемые эксципиенты можно использовать по отдельности или в комбинации двух или нескольких.

[0018]

#### A-3. Форма

Фармацевтическая композиция А может представлять собой жидкий состав (например, инъекции, глазные капли, назальные капли и суспензии), твердый состав (например, таблетки, гранулы и порошки), полутвердый состав (например, мази и

суппозитории), или другие дозированные формы, известные специалисту в данной области техники.

[0019]

#### A-4. Введение

Фармацевтическая композиция А может быть предназначена для перорального или парентерального введения. Фармацевтическая композиция А может быть предназначена для местного введения. Фармацевтическая композиция А может быть предназначена для внутриглазного, ушного, интраназального, сублингвального, внутритрахеального, внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, интравенного, интравагинального или трансдермального введения. Фармацевтическая композиция А может быть предназначена для инъекций.

[0020]

Доза лекарственного средства толиапант может быть соответствующим образом выбрана в соответствии с целью введения, субъектом, которому вводят лекарственное средство, и состоянием субъекта. Нижний предел суточной дозы на килограмм массы тела субъекта может составлять, например, 0,01 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг или 1 мг. Верхний предел суточной дозы на килограмм массы тела субъекта также может быть выбран соответствующим образом, как и нижний предел. Верхний предел может составлять, например, 10 мг, 9 мг, 8 мг, 7 мг, 6 мг, 5 мг, 4 мг, 3 мг, 2 мг или 1 мг. Суточная доза на килограмм массы тела субъекта может находиться, например, в диапазоне от 0,01 мг до 5 мг, от 0,05 мг до 4 мг или от 0,1 мг до 3 мг. Суточная доза может составлять, например, 1 мг или более, 5 мг или более, 10 мг или более, 20 мг или более, 30 мг или более, 40 мг или более, 50 мг или более, 60 мг или более, 70 мг или более, 80 мг или более, 90 мг или более или 100 мг или более. Суточная доза может составлять, например, 500 мг или менее, 400 мг или менее, 300 мг или менее, 200 мг или менее, 190 мг или менее, 180 мг или менее, 170 мг или менее, 160 мг или менее, 150 мг или менее, 140 мг или менее, 130 мг или менее, 120 мг или менее, 110 мг или менее или 100 мг или менее. Суточная доза может находиться, например, в диапазоне от 1 до 300 мг, от 5 до 200 мг или от 10 до 180 мг. Когда лекарственное средство толиапант содержит соль или сольват толиапанта, доза лекарственного средства толиапант может представлять собой количество, выраженное в пересчете на массу свободной формы толиапанта (т.е. соединения, представленного формулой (1)) или количество в пересчете на фактическую массу соли или сольвата толиапанта. В одном варианте осуществления, когда лекарственное средство толиапант находится в форме соли или сольвата толиапанта, доза лекарственного средства толиапант представляет собой количество, выраженное в пересчете на массу свободной формы толиапанта. Суточная доза может вводиться разделенными дозами два или несколько раз (например, два или три раза), так чтобы суточная доза попадала в диапазон, описанный выше; однако лекарственное средство толиапант предпочтительно вводят один раз в виде одной дозы. Доза лекарственного средства толиапант может быть ниже, чем доза при отдельном введении,

или может быть количеством, неэффективным при отдельном введении. Даже при введении в таком количестве, лекарственное средство толинапант может демонстрировать превосходную эффективность, основанную на его введении с модифицированной иммунной клеткой.

[0021]

Фармацевтическую композицию А можно вводить с любой частотой. Например, фармацевтическую композицию А можно вводить один, два или три раза в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в шесть дней, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. Фармацевтическую композицию А можно продолжать вводить в течение заранее определенного периода (например, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель) с частотой, описанной выше (например, один раз в день), и затем введение можно прекратить на заранее определенный период (например, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели). Цикл продолжения введения и прекращения можно повторить. Например, один цикл может состоять из введения фармацевтической композиции А один раз в день в течение 7 дней и последующего прекращения приема в течение 7 дней. Этот цикл может повторяться один, два и более раз.

[0022]

Фармацевтическую композицию А можно вводить перед введением модифицированной иммунной клетки, например, за 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 10 минут, 20 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 1 неделю до введения. Фармацевтическую композицию А можно вводить одновременно с введением модифицированной иммунной клетки. Фармацевтическую композицию А можно вводить после введения модифицированной иммунной клетки, например, сразу после введения или через 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 10 минут, 20 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 1 неделю после введения. Фармацевтическую композицию А также можно вводить, например, после введения модифицированной иммунной клетки и когда уровень опухолевого маркера превышает исходный уровень.

[0023]

Например, другую химиотерапию (введение одного или нескольких других лекарственных средств) или не химиотерапию (например, радиационную терапию, фотодинамическую терапию, хирургию и ограничение питания) можно проводить между введением фармацевтической композиции А и введением модифицированной иммунной клетки, или между введением фармацевтической композиции А и последующим введением фармацевтической композиции А. Примеры таких других лекарственных средств включают алкилирующие агенты, ингибиторы метилирования ДНК и антиметаболиты (например, пиримидиновые антиметаболиты, пуриновые

антиметаболиты и фолатные антиметаболиты).

[0024]

Примеры субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию А, включают, но не ограничены ими, людей, собак, кошек, обезьян, овец, лошадей, крупный рогатый скот, мышей и крыс. Субъект, которому вводят фармацевтическую композицию А, также может быть субъектом, которому вводят или которому вводили модифицированную иммунную клетку. Субъект, которому вводят фармацевтическую композицию А, предпочтительно, является субъектом, нуждающимся в профилактике и/или лечении заболевания, связанного с IAP, в частности, рака (или пациентом с первичным заболеванием, или пациентом с рецидивирующим заболеванием).

[0025]

Состав, способ производства, способ введения и т.д. для фармацевтической композиции А могут быть разработаны на основе, например, описания в WO2015/092420 (которое полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0026]

#### А-5. Фармацевтическое применение

Фармацевтическая композиция А не имеет особых ограничений в применении, пока она используется для применения, при котором может быть повышен эффект (терапевтический эффект при генно-модифицированной иммунотерапии) фармацевтической композиции В. Фармацевтическую композицию А можно использовать, например, для профилактики и/или лечения заболевания, связанного с IAP. В настоящем описании, термин «профилактика» используется для включения значения, например, профилактики рецидива. Термин «лечение» используется для обозначения, например, профилактики или задержки прогрессирования, облегчения, смягчения и ремиссии. Примеры заболеваний, связанных с IAP, включают нарушения, связанные с накоплением клеток (например, рак, аутоиммунные нарушения, воспаление и рестеноз), нарушения, при которых чрезмерный апоптоз приводит к потере клеток (например, нейродегенерация, такая как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и боковой амиотрофический склероз, ишемия, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, остеопороз и СПИД). В настоящем описании, «рак» означает опухоль в широком смысле и может использоваться как синоним «опухоли». Заболевание, связанное с IAP, предпочтительно, представляет собой рак. Рак может представлять собой рак, чувствительный к антагонизму по меньшей мере одного IAP, выбранного из группы, состоящей из XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ILP2, ML-IAP, сурвивина и BRUCE, более конкретно, XIAP, cIAP1, cIAP2 и ML-IAP, даже более конкретно, XIAP, cIAP1 и cIAP2, и наиболее конкретно, XIAP. Рак может быть рецидивирующим или трудно поддающимся лечению раком.

[0027]

Рак может представлять собой солидный рак или рак крови. Салидный рак может представлять собой рак эпителиального происхождения, рак мезенхимального



происхождения или другие раки.

[0028]

В одном варианте осуществления примеры солидного рака включают, но не ограничены ими, переходный эпителиальный рак; раки мочевого пузыря и мочевыводящих путей; рак молочной железы; раки желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку и задний проход); рак печени (например, гепатоцеллюлярный рак и гепатобластому); раки желчного пузыря и желчных путей (например, рак желчных протоков); рак поджелудочной железы (например, эндокринный рак поджелудочной железы, такой как метастатический рак поджелудочной железы, и экзокринные раки поджелудочной железы, такие как аденокарцинома протоков поджелудочной железы); рак почки (например, почечно-клеточную карциному и нефробластому); рак легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярную эпителиальную карциному и мезотелиомы); рак головы и шеи (например, раки языка, полости рта, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух); раки глаз и придатков (например, ретинобластому); раки яичников, маточных труб, брюшины, влагалища, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия и эндометрия; раки щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы, папиллярный рак щитовидной железы, недифференцированный рак щитовидной железы и фолликулярный рак щитовидной железы); рак надпочечников (например, адренокортикальную карциному); рак предстательной железы (например, гормоно-рефрактерный рак предстательной железы); и раки кожи (например, меланому (например, злокачественную меланому 3 и 4 стадии), базальноклеточный рак, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), кератоакантому, диспластический невус и грибовидный микоз). В одном варианте осуществления другие примеры солидного рака включают, но не ограничены ими, карциному из клеток Меркеля, метастатическую немелкоклеточную карциному, метастатический рак молочной железы, метастатический колоректальный рак, метастатический рак желудка, метастатический неурогенитальный рак, метастатический немелкоклеточный рак легких, метастатический рак яичников, метастатический почечно-клеточный рак, инфекцию HBV и родственные раки, а также заболевания вульвы.

[0029]

В одном варианте осуществления другие примеры солидных раков включают, но не ограничены ими, саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как саркома мягких тканей, остеосаркома, фибросаркома, хондросаркома, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, гемангиосаркома, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальная саркома, эпителиосаркома, желудочно-кишечная стромальная опухоль, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы и выбухающая дерматофибросаркома.

[0030]

В одном варианте осуществления другие примеры солидных раков включают, но

не ограничены ими, опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитому, глиому, глиобластому, менингиому, опухоль головного мозга, эпендимому, опухоль шишковидной железы и шванному); эндокринные опухоли (например, опухоль гипофиза, опухоль надпочечников, опухоль островковых клеток поджелудочной железы, опухоль парашитовидной железы, карциноидную опухоль и медуллярную карциному щитовидной железы); зародышевые и трофобластические опухоли (например, тератому, семиному, дисгерминому, хориоаленному и хориокарциному); педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластому, нейробластому, опухоль Вильмса и примитивную нейроэктодермальную опухоль); и синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента склонным к злокачественным новообразованиям (например, пигментную ксеродермию).

[0031]

Примеры рака крови включают, но не ограничены ими, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ALL) (например, В-ALL и Т-ALL) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) (например, волосатоклеточный лейкоз и пролимфоцитарный лейкоз); В-клеточные лимфомы (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL), фолликулярную лимфому, лимфому Беркитта, мантийно-клеточную лимфому и лимфобластный лейкоз); В-клеточную лимфому маргинальной зоны, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности, лимфоплазмоцитарную лимфому и лимфому маргинальной зоны селезенки); Т-клеточную лимфому (например, периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), кожную Т-клеточную лимфому (CTCL), Т-клеточную лимфому взрослых, анапластическую крупноклеточную лимфому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому и синдром Сезари); лимфому из естественных клеток-киллеров (NK); лимфому Ходжкина (HL); неходжкинскую лимфому; МАЛТ лимфому; первичную лимфому центра кожного фолликула (PCFCL); Т-клеточный лейкоз (например, Т-клеточный лейкоз взрослых, Т-клеточный лейкоз крупных гранулярных лимфоцитов и предшественник Т-лимфобластного лейкоза); лейкоз/лимфому; Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых (ATLL); волосатоклеточный лейкоз; моноклональную  $\gamma$ -глобулинемию неизвестного значения; плазмоцитому; множественную миелому (ММ) и пост-трансплантационное лимфопролиферативное нарушение; острый миелобластный лейкоз; миелоидный лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз (AML) и хронический миелоидный лейкоз (CML); хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML); миелопролиферативные синдромы (например, первичный миелофиброз, гиперэозинофильный синдром, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию), миелодиспластический синдром и промиелоидный лейкоз.

[0032]

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак крови, который

включает, например, острый миелоидный лейкоз (AML), Т-клеточную лимфому (периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), кожную Т-клеточную лимфому (CTCL), Т-клеточный лейкоз-лимфому взрослых (ATLL), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), острый лимфобластный лейкоз (ALL) и диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL). В другом варианте осуществления рак представляет собой рак крови, который включает множественную миелому.

[0033]

В одном варианте осуществления рак представляет собой солидный рак, который включает, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак толстой кишки, меланому, рак прямой кишки, рак мочевого пузыря и шейки матки и рак молочной железы.

[0034]

В. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора

Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) или рекомбинантного Т-клеточного рецептора (TCR) (называемая ниже «фармацевтической композицией В») по настоящему изобретению, предпочтительно, представляет собой фармацевтическую композицию для введения в комбинации с лекарственным средством толипапант (которое может быть в форме фармацевтической композиции А). В частности, фармацевтическую композицию предпочтительно вводят до, одновременно или после введения лекарственного средства толипапант.

[0035]

Химерный антигенный рецептор (CAR) или рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) распознает и связывается со специфическим антигеном. Антиген предпочтительно представляет собой опухолевый антиген. Примеры опухолевого антигена включают, но не ограничены ими, 5T4,  $\alpha 5\beta 1$ -интегрин, интегрин  $\beta 7$  (например, активированный интегрин  $\beta 7$ ), 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE,  $\beta$ -катенин/m, Bcr-abl, антитело MN/C IX, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CDC27/m, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CD98, CDK4/m, CEA, CT, Сур-В, DAM, EGFR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/new, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (или hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/мелан-А, MART-2/Ski, MC1R, миозин/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, PAP, протеиназу-3, минорный p190 bcr-abl, Pml/RAR $\alpha$ , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, сурвивин, TEL/AML1, TGF $\beta$ , TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF, WT 1, NY-ESO-1, NY-ESO-B, MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4. В одном варианте осуществления опухолевый антиген предпочтительно представляет собой CD19,

интегрин  $\beta 7$  или NY-ESO-1. В другом варианте осуществления опухолевый антиген предпочтительно представляет собой CD19, активированный интегрин  $\beta 7$  или NY-ESO-1.

[0036]

### B-1. CAR

CAR предпочтительно содержит внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

[0037]

#### B-1-1. Внеклеточный домен

Внеклеточный домен особо не ограничен при условии, что он может распознавать антиген (или связываться или специфически связываться с антигеном). Внеклеточный домен предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт антитела или антигенсвязывающий (или лигандсвязывающий) сайт рецептора.

[0038]

Антигенсвязывающий сайт антитела может представлять собой всю область антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. Антитело также может представлять собой, например, антитело мыши, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью гуманизированное антитело. Антигенсвязывающий фрагмент особо не ограничен при условии, что он содержит вариабельные области H (тяжелых) цепей и L (легких) цепей. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают, но не ограничены ими, Fv, Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, scFv, scFv-Fc, диатело, триатело, тетратело, минитело и нанотело.

[0039]

Антигенсвязывающий сайт рецептора может представлять собой всю область рецептора или может представлять собой антигенсвязывающий домен рецептора. Примеры рецептора включают TCR, такие как TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ ; T-клеточные корецепторы, такие как CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD11A, CD11B, CD11C, CD18, CD29, CD41, CD49A, CD49B, CD49D, CD49E, CD49F, CD51 и CD61; и естественные рецепторы цитотоксичности (NCR) NK-клеток, такие как NKp30, NKp44 и NKp46.

[0040]

В одном варианте осуществления внеклеточный домен предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт антитела, более предпочтительно, scFv, и даже более предпочтительно, scFv, полученный из антитела против CD19 человека (например, FMC63) или антитела против активированного интегрин  $\beta 7$  человека (например, MMG49). scFv можно получить широко используемым способом. Примеры способа включают, но не ограничены ими, способы, описанные в патенте США № 4694778; Science, vol. 242, pp. 423-442 (1988); Nature, vol. 334, p. 54454 (1989); Science, vol. 242, pp. 1038-1041 (1988); и Molecular Immunology, Vol. 34, No. 16-17, pp. 1157-1165 (1997).

[0041]

Антиген, который может распознавать внеклеточный домен или с которым может

связываться внеклеточный домен, предпочтительно, представляет собой опухолевый антиген. Примеры опухолевого антигена включают, но не ограничены ими, 5T4,  $\alpha 5\beta 1$ -интегрин, интегрин  $\beta 7$  (например, активированный интегрин  $\beta 7$ ), 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE,  $\beta$ -катенин/m, Bcr-abl, антитело MN/C IX, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CDC27/m, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CD98, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, EGFR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/new, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (или hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/мелан-А, MART-2/Ski, MC1R, миозин/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, PAP, протеиназу-3, p190 минорный bcr-abl, Pml/RAR $\alpha$ , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, сурвивин, TEL/AML1, TGF $\beta$ , TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF, WT1, NY-ESO-1 и NY-ESO-B. В одном варианте осуществления опухолевый антиген предпочтительно представляет собой CD19 или интегрин  $\beta 7$ . В другом варианте осуществления опухолевый антиген предпочтительно представляет собой CD19 или активированный интегрин  $\beta 7$ . В другом варианте осуществления опухолевый антиген предпочтительно представляет собой активированный интегрин  $\beta 7$ . CAR, способный распознавать или связываться с CD19, называется «CD19 CAR». Т-клетка и NK-клетка, модифицированные для экспрессии CD19 CAR, называются «CD19 CAR-T» и «CD19 CAR-NK», соответственно. Примеры CD19 CAR-NK включают CD19 CAR-KHYG-1. Примеры CAR, способных распознавать активированный интегрин  $\beta 7$  или связываться с ним, включают активированный интегрин  $\beta 7$  CAR. Т-клетка, модифицированная для экспрессии активированного интегрин  $\beta 7$  CAR, называется «активированным интегрином  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T)».

[0042]

В одном варианте осуществления внеклеточный домен предпочтительно содержит CDR 1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (GVSLPDYG), CDR 2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (IWGSETT), CDR 3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (AKHYYYGGSYAMDY), CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (QDISKY), CDR 2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (HTS) и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (QQGNTLPYT). В настоящем описании, CDR 1-3 тяжелой цепи и CDR 1-3 легкой цепи идентифицированы путем поиска гомологии с помощью IMGT/BlastSearch (<http://www.imgt.org/blast/>).

Кроме того, внеклеточный домен предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт (в частности, scFv) антитела, которое конкурентно ингибирует связывание, с CD19, антитела, содержащего CDR 1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

[0043]

В одном варианте осуществления внеклеточный домен предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт (в частности, scFv) антитела, которое конкурентно ингибирует связывание, с CD19, антитела, содержащего CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (GYTFSSYW), CDR 2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (MLPGSGSS), CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (ARGDGNWYFDV), CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (SSVGY), CDR 2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (ATS), и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (QQWSSDPPT).

Кроме того, внеклеточный домен предпочтительно содержит CDR 1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность кислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

[0044]

В одном варианте осуществления внеклеточный домен предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт антитела, имеющего эпитоп в области, состоящей из аминокислотных остатков с 20 по 109 активированного интегрин  $\beta 7$  человека. Предпочтительно, антитело имеет аффинность к активированному интегрину  $\beta 7$  человека и связывается с клетками миеломы, но не связывается с нормальными клетками крови. Активированный интегрин  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T) по настоящему изобретению описан в WO 2017/026331 или Nature Medicine 23 12 2007 1436, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0045]

В настоящем описании «идентичность» аминокислотной последовательности относится к степени идентичности аминокислот, когда две или несколько сравниваемых аминокислотных последовательностей оптимально выровнены. Идентичность аминокислотной последовательности можно рассчитать, например, с помощью параметров по умолчанию в алгоритме гомологии BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Национального центра Биотехнологической информации (NCBI). «Консервативная замена» означает, что одна или несколько аминокислот заменяются одной или несколькими другими аминокислотами таким

образом, что функция или свойство белка по существу не изменяются. Примеры консервативной замены включают, но не ограничены ими, замену группы неполярных аминокислот (гидрофобных аминокислот): аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), пролина (P), фенилаланина (F), метионина (M) и триптофана (W); замену группы полярных аминокислот (нейтральных аминокислот): глицина (G), аспарагина (N), глутамина (Q), серина (S), треонина (T), тирозина (Y) и цистеина (C); замену группы кислых аминокислот: аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E); и замену основных аминокислот: лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H).

[0046]

Равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ), которая представляет собой аффинность связывания внеклеточного домена с антигеном, составляет, например, 1 мкМ или менее, 500 нМ или менее или 100 нМ или менее, и 0,1 пМ или более, 0,5 пМ или более или 1 пМ или более. Равновесную константу диссоциации можно определить, например, путем измерения SPR или анализа Biacore (торговая марка).

[0047]

Внеклеточный домен может содержать, в дополнение к антигенсвязывающему сайту антитела или антигенсвязывающему (лигандсвязывающему) сайту рецептора, внеклеточные домены других белков. Примеры таких других белков включают, но не ограничены ими, T-клеточные корецепторы, такие как CD3 $\zeta$ , CD3 $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX40), CD137, CD154 и CD278 (ICOS). В одном варианте осуществления внеклеточный домен таких других белков предпочтительно представляет собой внеклеточный домен CD28. В другом варианте осуществления внеклеточный домен другого белка представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13: IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP,

аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, имеющую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

[0048]

#### B-1-2. Межклеточный сигнальный домен

Внутриклеточный сигнальный домен особо не ограничен, при условии, что, когда внеклеточный домен распознает антиген, сигналы могут передаваться в клетки. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно имеет антигензависимую первичную активационную последовательность (первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность) и антиген-независимую вторичную активационную или костимулирующую последовательность (вторичные

цитоплазматические сигнальные последовательности).

[0049]

Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность может иметь сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) (Nature, vol. 338, pp. 383-384 (1989)) и/или может иметь сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (J Immunol., vol. 162, No. 2, pp. 897-902 (1999)).

[0050]

Внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, предпочтительно, содержит один или несколько ITAM или предпочтительно, имеет экзогенный STAT3-связанный мотив. Примеры внутриклеточного сигнального домена включают, но не ограничены ими, внутриклеточные сигнальные домены CD3 $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно представляет собой внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность SEQ: 14: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR,

аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, или

аминокислотную последовательность, имеющую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотную последовательность.

[0051]

Внутриклеточный сигнальный домен, имеющий вторичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, предпочтительно представляет собой внутриклеточный сигнальный домен одной или нескольких костимулирующих молекул. Примеры костимулирующих молекул включают, но не ограничены ими, CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD154 и CD278 (ICOS). В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно представляет собой внутриклеточный сигнальный домен CD28 и/или внутриклеточный сигнальный домен CD137 (4-1BB), и более предпочтительно, внутриклеточный сигнальный домен CD28. В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15: RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS,

аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или



более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, или аминокислотную последовательность, имеющую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

[0052]

CAR может также иметь дополнительный внутриклеточный сигнальный домен, отличный от упомянутых выше. Например, CAR может иметь домен, индуцирующий экспрессию цитокина (например, IL-12). CAR может также содержать внутриклеточный домен (например, фрагмент  $\beta$ -цепи IL-2R) цитокинового рецептора. Дополнительный внутриклеточный сигнальный домен может быть вставлен, например, между внутриклеточным сигнальным доменом костимулирующей молекулы и первичной цитоплазматической сигнальной последовательностью.

[0053]

#### B-1-3. Трансмембранный домен

CAR предпочтительно содержит трансмембранный домен между внеклеточным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. Трансмембранный домен может быть получен из любого полипептида и может иметь одну или несколько трансмембранных последовательностей. Полипептид может представлять собой существующий в природе полипептид или искусственный полипептид.

[0054]

Примеры трансмембранного домена, полученного из существующего в природе полипептида, включают TCR, такие как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ ; T-клеточные корецепторы, такие как CD3 $\zeta$ , CD3 $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX40), CD137, CD154 и CD278 (ICOS); и трансмембранные домены рецепторов TNF, такие как GITR.

[0055]

Предпочтительно, трансмембранный домен, полученный из искусственного полипептида, главным образом содержит полипептид, содержащий гидрофобный остаток, такой как лейцин и валин. Трансмембранный домен предпочтительно имеет на каждом конце триплет фенилаланина, триптофана и валина.

[0056]

В одном варианте осуществления трансмембранный домен предпочтительно представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8, и более предпочтительно, трансмембранный домен CD28. В другом варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16: FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV,

аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или

99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, или аминокислотную последовательность, содержащую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0057]

#### В-1-4. Линкерная последовательность или спейсерный домен

CAR может иметь линкерную последовательность или спейсерный домен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом или между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом.

[0058]

Пока линкерная последовательность или спейсерный домен выполняют функцию соединения двух доменов, особых ограничений нет. Линкерная последовательность предпочтительно содержит 10 или менее аминокислот, и предпочтительно содержит 2 и более аминокислот. Спейсерный домен предпочтительно содержит 300 аминокислот или менее, 200 аминокислот или менее, 100 аминокислот или менее или 50 аминокислот или менее, и предпочтительно, содержит 10 аминокислот или более, 15 аминокислот или более, 20 аминокислот или более, или 25 аминокислот или более.

[0059]

Линкерная последовательность предпочтительно выбрана из непрерывной глицин-сериновой последовательности, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 (GSTSGGGSGGGSGGGSS).

[0060]

Спейсерный домен предпочтительно имеет последовательность, которая способствует связыванию CAR и антигена и усиливает передачу сигнала клеткам. Последовательность предпочтительно содержит, например, цистеин, заряженные аминокислоты или серин или треонин внутри потенциального сайта гликозилирования. Примеры спейсерного домена включают, но не ограничены ими, часть CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28 или IgG4 (например, шарнирную область).

[0061]

CAR может содержать лидерную последовательность (последовательность сигнального пептида) на N-конце. Последовательность сигнального пептида предпочтительно содержит 15 или более аминокислот, и предпочтительно, содержит 30 или менее аминокислот. Примеры сигнального пептида включают, но не ограничены ими, белки, имеющие внутриклеточный сигнальный домен. Сигнальный пептид может представлять собой, например, сигнальный пептид GM-CSFR, сигнальный пептид онкостатина М или сигнальный пептид, такой как CD8 $\alpha$ , IL-2 или IL-3. Альтернативно, сигнальный пептид может представлять собой сигнальную последовательность тяжелой цепи Ig (VHCAMP). Сигнальный пептид может быть получен из человеческого или не человеческого источника, такого как клетки насекомых или вирусы. В одном варианте

осуществления лидерная последовательность (последовательность сигнального пептида) предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP,

аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, или аминокислотную последовательность, имеющую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0062]

В одном варианте осуществления CAR предпочтительно содержит, начиная с N-конца, scFv, полученный из антитела против CD19 человека (например, FMC63) или антитела против активированного интегрин  $\beta 7$  человека (например, MMG49), внеклеточный домен CD28, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ . CAR предпочтительно дополнительно содержит сигнальный пептид GM-CSFR на N-конце scFv, полученный из антитела против CD19 человека (например, FMC63) или антитела против активированного интегрин  $\beta 7$  человека (например, MMG49).

[0063]

В другом варианте осуществления CAR предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (№ доступа GenBank HM852952.1): MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKDITYDALHMQALPPR,

аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6 и имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20 или

аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6 и содержащую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление от 1 до 3 аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0064]

Кроме того, в другом варианте осуществления CAR предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21: MDFQVQIFSLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVGYMHWFQQK PGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFG GGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFSSYWIE WVKQRPGHGLEWIGEMLPGSGSSNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARGDGNWYFDVWGAGTTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKD TYDALHMQUALPPR,

аминокислоту, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12 и имеющую 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21, или

аминокислоту, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12 и имеющую делецию, замену (например, консервативную замену), вставку и/или добавление 1-3 аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

[0065]

CAR может быть мультимеризован, например димеризован. Например, когда CAR димеризуется через дисульфидную связь, цистеин предпочтительно встраивают в спейсерный домен и/или трансмембранный домен CAR.

[0066]

### В-2. Рекомбинантный TCR

Рекомбинантный TCR может представлять собой гетеродимер, состоящий из  $\alpha$  и  $\beta$  цепей, или может представлять собой гетеродимер, состоящий из  $\gamma$  и  $\delta$  цепей. Каждая цепь имеет переменный домен (домен V) и стационарный домен (домен C), где домен V имеет три CDR, т.е. CDR1, CDR2 и CDR3, и сконструирован таким образом, что три последовательности CDR могут распознавать или связываться с антигеном.

[0067]

Рекомбинантный TCR может распознавать (или связываться с) любой антиген. Другими словами, рекомбинантный TCR может иметь переменный домен, способный распознавать антиген. Примеры антигена могут быть такими же, как упомянуты в В-1-1. В одном варианте осуществления антиген предпочтительно представляет собой опухолевый антиген, и предпочтительно, представляет собой gp100, MART-1, CEA, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, WT1 или NY-ESO-1. Антиген предпочтительно является антиген А лейкозных клеток человека (HLA-A)-рестриктивным, и более предпочтительно, является HLA-A\*02-рестриктивным (например, HLA-A\*02:01-рестриктивным, HLA-A\*02:06-

рестриктивным) или HLA-A\*24-рестриктивным (например, HLA-A\*24:02-рестриктивным). Рекомбинантный TCR может быть HLA-A\*02-рестриктивным, gp100-специфичным TCR, HLA-A\*02-рестриктивным, MART-1-специфичным TCR, HLA-A\*02-рестриктивным, MAGE-A3-специфичным TCR, HLA-A\*02-рестриктивным, NY-ESO-1-специфичным TCR, HLA-A\*24-рестриктивным, MAGE-A4-специфичным TCR или HLA-A\*24-рестриктивным, WT1-специфичным TCR. TCR, способный распознавать или связываться с NY-ESO-1, называется «NY-ESO-1 TCR». Т-клетка, модифицированная для экспрессии NY-ESO-1 TCR, называется «NY-ESO-1 TCR-T».

[0068]

Равновесная константа диссоциации ( $K_d$ ), которая представляет аффинность связывания рекомбинантного TCR с антигеном, может составлять, например, 100 мкМ или менее, 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 500 нМ или менее или 100 нМ или менее, и может составлять, например, 0,1 мкМ или более, 0,5 мкМ или более или 1 мкМ или более. Равновесную константу диссоциации можно определить, например, путем измерения SPR или анализа Biacore (торговая марка).

[0069]

В-3. Иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR или рекомбинантного TCR

Иммунная клетка, модифицированная для экспрессии CAR (например, CAR-T-клетки и CAR-NK-клетки), предпочтительно представляет собой иммунную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту для экспрессии CAR (содержащую конструкцию нуклеиновой кислоты). Подобным образом, иммунная клетка (например, TCR-T-клетки), модифицированная для экспрессии рекомбинантного TCR, предпочтительно представляет собой иммунную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту для экспрессии рекомбинантного TCR (включая конструкцию нуклеиновой кислоты).

[0070]

В-3-1. CAR или рекомбинантная нуклеиновая кислота для экспрессии TCR

CAR или нуклеиновая кислота для экспрессии рекомбинантного TCR предпочтительно содержит промотор в дополнение к нуклеиновой кислоте, кодирующей CAR или рекомбинантный TCR. Примеры промотора включают, но не ограничены ими, промоторы  $\rho$ l II, такие как промотор CMV, промотор EF1, промотор SV40 и промотор MSCV; промоторы триптофана, такие как *trc* и *tac*; промотор *lac*; промотор T7; промотор T5; промотор T3; промотор SP6; индуцируемый арабинозой промотор; промотор холодного шока; индуцируемый тетрациклином промотор; убиквитиновый промотор; и подобные.

[0071]

CAR или нуклеиновая кислота для экспрессии рекомбинантного TCR могут дополнительно содержать один или несколько других элементов. Примеры таких других элементов включают, но не ограничены ими, точки начала репликации, энхансерные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности,

кодирующие репортерный белок, и последовательности, кодирующие резистентные к лекарственным средствам гены.

[0072]

Нуклеиновая кислота для экспрессии рекомбинантного TCR предпочтительно содержит последовательность, которая ингибирует экспрессию эндогенного TCR (например, миРНК против эндогенной  $\alpha$  цепи и  $\beta$  цепи TCR), как описано, например, в WO2008/153029 (которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

[0073]

CAR или нуклеиновая кислота для экспрессии рекомбинантного TCR может быть в форме вектора. Вектор может быть невирусным вектором, но предпочтительно, представляет собой вирусный вектор.

[0074]

Примеры вирусного вектора включают, но не ограничены ими, ретровирусные векторы (включая онкоретровирусные векторы, лентивирусные векторы и псевдотипические векторы), аденовирусные векторы, векторы аденоассоциированного вируса (AAV), векторы вируса обезьяны, векторы вируса коровьей оспы или векторы вируса Сендай, векторы вируса Эпштейн-Барр (EBV) и векторы HSV. В качестве вирусного вектора также можно использовать вирусный вектор, у которого отсутствует способность к самовоспроизведению, поэтому он не воспроизводится внутри инфицированных клеток.

[0075]

#### В-3-2. Иммунная клетка

Иммунная клетка особо не ограничена, при условии, что она может быть модифицирована для экспрессии CAR или рекомбинантного TCR. Примеры иммунных клеток включают, но не ограничены ими, моноциты, макрофаги, Т-клетки, В-клетки и NK-клетки. В одном варианте осуществления иммунная клетка предпочтительно представляет собой Т-клетку или NK-клетку. Примеры Т-клеток включают, но не ограничены ими, CD4-положительные Т-клетки (например, хелперные Т-клетки), CD8-положительные Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), естественные Т-клетки-киллеры, регуляторные Т-клетки (Treg), наивные Т-клетки, эффекторные Т-клетки, Т-клетки памяти, инфильтрующие опухоли лимфоциты (TIL),  $\alpha\beta$  Т-клетки и  $\gamma\delta$  Т-клетки. Иммунные клетки обычно могут представлять собой популяцию клеток. Популяция клеток может представлять собой, например, популяцию клеток, содержащую моноклеональные клетки периферической крови (PBMNC). Хотя иммунные клетки можно дифференцировать от гемопоэтических стволовых клеток, иммунные клетки предпочтительно представляют собой клетки, полученные из живого организма, такие как клетки, собранные из живого организма (например, периферической крови, пуповинной крови, костного мозга, лимфатических узлов и селезенки), или клетки, собранные из живого организма и подвергнутые размножению в культуре. Иммунная клетка может

представлять собой аутологичные иммунные клетки (иммунные клетки субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию В) или аллогенные иммунные клетки. Когда в качестве иммунной клетки используют аллогенную иммунную клетку, тип HLA предпочтительно является тем же самым.

[0076]

В одном варианте осуществления иммунную клетку можно стимулировать растворимым или мембраносвязанным анти-CD3 антителом (например, ОКТ3 или mОКТ3) и/или APC (например, искусственной APC) перед трансдукцией. APC может экспрессировать анти-CD3 моноклональное антитело мембранного типа.

[0077]

В-3-3. Трансдукция нуклеиновой кислоты для экспрессии CAR или рекомбинантного TCR в иммунные клетки

Примеры способа трансдукции CAR или нуклеиновой кислоты для экспрессии рекомбинантного TCR в иммунную клетку включают, но не ограничены ими, способ вирусной инфекции, способ фосфата кальция, способ липофекции, способ микроинъекции и способ электропорации.

[0078]

В-3-4. Неограничивающие примеры модифицированных иммунных клеток

Среди модифицированных иммунных клеток, примеры CAR-T-клеток включают, но не ограничены ими, Т-клетки, модифицированные для экспрессии CD19 CAR (например, Yescarta (аксикабтаген цилолейцел), производимые Gilead, Kymriah (тисагенлеклейцел), производимые Novartis, Breyanzi (лизокабтаген маралейцел), производимые Bristol-Myers Squibb, TBI-1501, производимые Takara Bio Inc., и UCART19/ALLO-501, производимые Nihon Servier), Т-клетки, модифицированные для экспрессии BCMA CAR (например, bb2121, ide-cel, производимые Celgene Corporation, и JNJ-68284528, производимые Janssen Pharmaceutical KK), Т-клетки, модифицированные для экспрессии CAR CD98 (например, Т-клетки, модифицированные для экспрессии CAR, описанные в публикации заявки на патент США № 2018/0230212, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки) и Т-клетки, модифицированные для экспрессии активированного интегрин  $\beta 7$  CAR (например, публикация патентной заявки США № 2018/0230216, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Примеры TCR-T-клеток включают, но не ограничены ими, NY-ESO-1-специфичные TCR-T-клетки (например, NY-ESO-1 TCR-T Triple Knockout TCR (NYCE), производимые Tmunity, и TBI-1301, производимые Takara Bio Co., Ltd.), MAGE-A4-специфичные TCR-T-клетки (например, ADP-A2M4 SPEAR Т-клетки, производимые Adaptimmune) и MAGE-A3 и/или MAGE-A6-специфичные TCR-T-клетки (например, KITE-718, производимые Kite/Gilead Sciences). В одном варианте осуществления модифицированная иммунная клетка предпочтительно представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии CAR, которая специфически распознает CD19, Т-клетку, модифицированную для экспрессии CAR, которая специфически распознает

интегрин  $\beta 7$  (например, активированный интегрин  $\beta 7$ ), NK-клетку, модифицированную для экспрессии CAR, которая специфически распознает CD19, или T-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного TCR, которая специфически распознает NY-ESO-1.

[0079]

#### В-4. Другие компоненты

Фармацевтическая композиция В предпочтительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент в качестве другого компонента. Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают те же эксципиенты, которые указаны в А-2. В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой по меньшей мере один член, выбранный из группы, состоящей из носителей (например, стерильной воды и солевого раствора), стабилизаторов, антиоксидантов (например, аскорбиновой кислоты), буферов (например, органических кислот, таких как фосфорная кислота и лимонная кислота), консервантов, поверхностно-активных веществ (например, полиэтиленгликоля и Tween), хелатирующих агентов (например, ЭДТК), сахаров или сахарных спиртов (например, глюкозы, маннозы, сахарозы и маннита), аминокислот (например, глицина, глутамина, аспарагина, аргинина и лизина), полипептидов или белков (например, сывороточного альбумина, желатина и иммуноглобулина) и адъювантов (например, адъювантов, таких как гидроксид алюминия).

[0080]

#### В-5. Введение

Нижний предел дозы модифицированной иммунной клетки может быть соответствующим образом выбран в соответствии с целью введения, субъектом, которому вводят модифицированную иммунную клетку, состоянием субъекта и т.д. Например, нижний предел суточной дозы в пересчете на количество жизнеспособных клеток на килограмм массы тела субъекта может составлять  $1 \times 10^2$  клеток,  $5 \times 10^2$  клеток,  $1 \times 10^3$  клеток,  $2 \times 10^3$  клеток,  $3 \times 10^3$  клеток,  $4 \times 10^3$  клеток,  $5 \times 10^3$  клеток,  $6 \times 10^3$  клеток,  $7 \times 10^3$  клеток,  $8 \times 10^3$  клеток,  $9 \times 10^3$  клеток,  $1 \times 10^4$  клеток,  $2 \times 10^4$  клеток,  $3 \times 10^4$  клеток,  $4 \times 10^4$  клеток,  $5 \times 10^4$  клеток,  $6 \times 10^4$  клеток,  $7 \times 10^4$  клеток,  $8 \times 10^4$  клеток,  $9 \times 10^4$  клеток или  $1 \times 10^5$  клеток. Верхний предел суточной дозы также может быть выбран соответствующим образом, как и нижний предел. Например, верхний предел суточной дозы в пересчете на количество жизнеспособных клеток на килограмм массы тела субъекта может составлять  $1 \times 10^9$  клеток,  $5 \times 10^8$  клеток,  $1 \times 10^8$  клеток,  $5 \times 10^7$  клеток,  $1 \times 10^7$  клеток,  $5 \times 10^6$  клеток или  $1 \times 10^6$  клеток на килограмм массы тела субъекта. Например, суточная доза на килограмм массы тела субъекта с точки зрения количества жизнеспособных клеток может составлять от  $1 \times 10^3$  клеток до  $1 \times 10^8$  клеток, от  $5 \times 10^3$  клеток до  $5 \times 10^7$  клеток или от  $1 \times 10^4$  клеток до  $1 \times 10^7$  клеток. Фармацевтическую композицию можно вводить двумя или несколькими разделенными дозами (например, 2 или 3 раза), чтобы суточная доза находилась в пределах диапазона, описанного выше, или можно вводить разделенными дозами в течение периода двух дней. Доза модифицированной иммунной клетки может быть



меньше, чем доза при отдельном введении, или количество, которое не эффективно при отдельном использовании. Даже когда модифицированную иммунную клетку вводят в таком количестве, модифицированная иммунная клетка может обеспечить превосходную эффективность благодаря введению в комбинации с лекарственным средством толипапант.

[0081]

Фармацевтическая композиция В может быть введена с любой частотой. Например, фармацевтическая композиция В может быть введена с частотой один, два или три раза в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в шесть дней, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. Фармацевтическую композицию В можно продолжать вводить с частотой, описанной выше (например, один раз в день) в течение заранее определенного периода времени (например, 1, 2, 3 или 4 недель), и затем введение можно прекратить на заданный период времени (например, 1, 2, 3 или 4 недели), и цикл продолжения введения и прекращения введения можно повторить.

[0082]

В одном варианте осуществления введение фармацевтической композиции В (или модифицированной иммунной клетки) предпочтительно включает стадии:

(1) введения фармацевтической композиции В (или модифицированной иммунной клетки);

(2) введения фармацевтической композиции В (или модифицированной иммунной клетки), полученной с помощью иммунной клетки, полученной от субъекта, которому вводили фармацевтическую композицию В (или модифицированную иммунную клетку);  
и

(3) повторения стадии (2), если необходимо.

[0083]

Фармацевтическая композиция В может быть введена перед введением лекарственного средства толипапант, например, непосредственно перед введением или за 1 минуту до, 2 минуты до, 3 минуты до, 4 минуты до, 5 минут до, 10 минут до, 20 минут до, 30 минут до, 1 час до, 2 часа до, 3 часа до, 4 часа до, 5 часов до, 6 часов до, 7 часов до, 8 часов до, 9 часов до, 10 часов до, 11 часов до, 12 часов до, 18 часов до, 24 часа до, 2 дня до, 3 дня до, 4 дня до, 5 дней до, 6 дней до или за 1 неделю до введения. Фармацевтическая композиция В может быть введена после введения лекарственного средства толипапант, например, сразу после введения или через 1 минуту, через 2 минуты, через 3 минуты, через 4 минуты, через 5 минут, через 10 минут, через 20 минут, через 30 минут, через 1 час, через 2 часа, через 3 часа, через 4 часа, через 5 часов, через 6 часов, через 7 часов, через 8 часов, через 9 часов, через 10 часов, через 11 часов, через 12 часов, через 18 часов, через 24 часа, через 2 дня, через 3 дня, через 4 дня, через 5 дней, через 6 дней или через 1 неделю после введения. Фармацевтическая композиция В также может быть введена, например, после введения лекарственного средства толипапант и когда

уровень опухолевого маркера выше исходного уровня.

[0084]

В период между введением фармацевтической композиции В и введением лекарственного средства толиапант, или в период после введения фармацевтической композиции В и перед введением следующей фармацевтической композиции В, например, может проводиться другая химиотерапия (введение одного или нескольких других лекарственных средств) или не химиотерапия (например, лучевая терапия, фотодинамическая терапия, хирургическое вмешательство и ограничения по питанию). Примеры других лекарственных средств включают, но не ограничены ими, алкилирующие агенты, ингибиторы метилирования ДНК, антиметаболиты (например, пиримидиновые антиметаболиты, пуриновые антиметаболиты и фолатные антиметаболиты).

[0085]

Субъект, которому вводят фармацевтическую композицию В, может быть, например, таким же, как и субъект, которому вводят фармацевтическую композицию А. Субъект, которому вводят фармацевтическую композицию В, может быть субъектом, которому вводят или ранее вводили лекарственное средство толиапант. Субъект, которому вводят фармацевтическую композицию В, предпочтительно является субъектом (или новым пациентом, или пациентом с рецидивом), нуждающимся в профилактике и/или лечении заболевания, связанного с IAP, в частности, рака.

[0086]

Состав, способ получения и способ введения фармацевтической композиции В могут быть разработаны на основе, например, описания в WO1993/019163 (которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

[0087]

#### В-6. Фармацевтическое применение

Пока фармацевтическую композицию В используют таким образом, что ее комбинированное применение с фармацевтической композицией А может повысить ее эффективность (терапевтический эффект при генно-модифицированной иммунотерапии), применение конкретно не ограничено. Заболеванием-мишенью для фармацевтической композиции В является, например, заболевание, для лечения которого применима генно-модифицированная иммунотерапия, обычно, рак. Примеры рака включают, но не ограничены ими, те же виды рака, которые упоминаются в качестве примеров для фармацевтической композиции А.

[0088]

#### С. Набор

Набор по настоящему изобретению предпочтительно содержит первый агент и второй агент,

где первый агент содержит соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль или его фармацевтически приемлемый сольват, и

второй агент содержит иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

[0089]

Первый агент предпочтительно содержит фармацевтическую композицию А. Второй агент предпочтительно содержит фармацевтическую композицию В. Первый агент и второй агент могут находиться в одном и том же составе и вводиться одновременно, или первый и второй агенты находятся в разных составах и вводятся одновременно, отдельно или последовательно.

[0090]

Различные признаки (свойства, структуры, функции и т.д.), описанные выше в каждом из вариантов осуществления, могут быть объединены любым способом для определения объекта, включенного в настоящее изобретение. Настоящее изобретение не ограничено описанными выше вариантами осуществления, но включает в себя все, что может распознать специалист в данной области техники на основе раскрытия в настоящем описании.

Примеры

[0091]

Объект, включенный в настоящее изобретение, описан более подробно ниже. Однако объект не ограничен примерами, описанными ниже.

[0092]

### 1. Тестируемые материалы и способ тестирования

#### 1.1 Тестируемая клетка

##### 1.1.1 Тестируемая клетка

1-1) Название клетки: CD19 CAR-T (производится Takara Bio Inc.)

1-2) Происхождение: Т-клетки периферической крови человека

1-3) Источник: Assicell и другие

Характеристики: тестируемая клетка, полученная следующим образом. Коммерчески доступные РМВС человека стимулируют анти-CD антителом (клон: ОКТ3) и полученные клетки оставляют расти в среде, содержащей ИЛ-2 (250 Ед/мл) для индукции Т-клеток. Последовательность, содержащая лидерную последовательность, последовательность одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), содержащую варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела против CD19 человека (клон: FMC63), связанные вместе, линкерную последовательность, последовательность, содержащую внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область молекулы CD28, и внутриклеточную область связанной молекулы CD3 $\zeta$  вводят в Т-клетки с помощью ретровирусного вектора, и полученные клетки выращивают и культивируют, и затем криоконсервируют для получения тестируемой клетки.

[0093]

2-1) Название клетки: активированный интегрин  $\beta$ 7 CAR-T-клетка

2-2) Происхождение: Т-клетки периферической крови человека

## 2-3) Источник: Assucell и другие

Характеристики: тестируемая клетка, полученная следующим образом. Коммерчески доступные PMBC человека стимулируют анти-CD антителом (клон: ОКТ3) и анти-CD28 антителом (клон: 28.2), и полученным клеткам дают возможность расти в среде, содержащей ИЛ-2 (100 ед/мл) для индукции Т-клетки. Последовательность, содержащая последовательность одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), содержащую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела против активированного интегрина  $\beta 7$  человека (клон: MMG49), связанные вместе, лидерную последовательность, линкерную последовательность, последовательность, содержащую внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область молекулы CD28, и внутриклеточную область связанной молекулы CD3 $\zeta$ , вводят в Т-клетки с помощью ретровирусного вектора, и полученные клетки выращивают и культивируют, и затем криоконсервируют для получения тестируемой клетки.

[0094]

3-1) Название клетки: HLA-A\*02:01-рестриктивный NY-ESO-1 TCR-T (далее именуемый «NY-ESO-1 TCR-T»)

3-2) Происхождение: Т-клетки периферической крови человека

3-3) Источник: Assucell и другие

Характеристики: тестируемая клетка, полученная следующим образом. Коммерчески доступные PMBC человека стимулируют анти-CD антителом (клон: ОКТ3) и анти-CD28 антителом (клон: 28.2), и полученным клеткам дают возможность расти в среде, содержащей ИЛ-2 (100 ед/мл), для индукции Т-клетки. Т-клетки инфицируют ретровирусным вектором MS3II-NYESO1-siTCR (Патент № 5969468), способным экспрессировать  $\alpha$  цепь и  $\beta$  цепь Т-клеточного рецептора (TCR), специфически распознающие HLA-A\*02:01-рестриктивный NY-ESO-1, и мРНК, интерферирующей с эндогенными генами  $\alpha$  и  $\beta$  цепи TCR, с получением таким образом генетически модифицированных Т-клеток (патент № 5271901 и патент № 5828861). Полученные Т-клетки затем криоконсервируют для получения тестируемой клетки.

[0095]

4-1) Название клеточных линий: CD19 CAR KHYG-1

4-2) Происхождение: NK-подобная клетка человека

4-3) Источник: JCRB

После получения клетки, создают линию экспрессии CD19 CAR.

4-4) Условия культивирования: культуральная среда RPMI 1640, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки, добавку, описанную ниже, и цитокин; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

а) Культуральная жидкость: RPMI 1640

і) Источник: Nacalai Tesque Inc.

б) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка

і) Концентрация: 10%

- ii) Источник: Sigma-Aldrich
- c) Добавка: смешанный раствор пенициллина-стрептомицина
- i) Концентрации: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина
- ii) Источник: Nacalai Tesque Inc.
- d) Цитокин: рекомбинантный IL-2 человека
- i) Концентрация: 100 Ед/мл
- ii) Источник: ReproTech

Характеристики: тестируемая клетка, полученная следующим образом. После того как линию NK-подобных клеток человека KHYG-1 трансфицируют с помощью ретровирусного вектора CD19 CAR и полученные клетки оставляют расти, положительные клетки сортируют с помощью FCM и снова подвергают культивированию, и затем криоконсервируют для получения тестируемых клеток.

[0096]

#### 1.1.2 Контрольная клетка

- 1-1) Название клеточной линии: контрольные Т-клетки (Т-клетки человека)
- 1-2) Происхождение: РМБС периферической крови человека
- 1-3) Источник: Assicell и другие

Характеристики: тестируемая клетка, полученная следующим образом. Коммерчески доступные РМБС человека стимулируют анти-CD антителом (клон: ОКТ3) и анти-CD28 антителом (клон: 28.2), и полученные клетки выращивают и культивируют в среде, содержащей IL-2 (100 Ед/мл), и затем криоконсервируют для получения тестируемой клетки.

[0097]

- 2-1) Название клеточной линии: KHYG-1
- 2-2) Происхождение: NK-подобная клетка человека
- 2-3) Источник: JCRB
- 2-4) Условия культивирования: культуральная среда RPMI 1640, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки, добавку, описанную ниже, и цитокин; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
  - a) Культуральная жидкость: RPMI1640
  - i) Источник: Nacalai Tesque, Inc.
  - b) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка
  - i) Концентрация: 10%
  - ii) Источник: Sigma-Aldrich
  - c) Добавка: смешанный раствор пенициллин-стрептомицина
  - i) Концентрации: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг /мл стрептомицина
  - ii) Источник: Nacalai Tesque, Inc.
  - d) Цитокин: рекомбинантный IL-2 человека
  - i) Концентрация: 100 Ед/мл
  - ii) Источник: ReproTech

[0098]

### 1.1.3 Приготовление клеточного разбавителя

Для приготовления клеточного разбавителя используют 47% инфузию бикарбоната, 20% инъекцию низкомолекулярного декстрана, 28% сывороточный альбумин человека 25%, и 5% диметилсульфоксид. После смешивания всех растворов, полученную смесь хранят в низкотемпературной морозильной камере (установленная температура -80°C) до использования.

[0099]

### 1.1.4 Приготовление раствора для введения тестируемых клеток и раствора для введения контрольных клеток

1) После быстрого размораживания криоконсервированных CD19 CAR-T в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в клеточном разбавителе и центрифугируют (800 x g, 5 мин, 4°C) для удаления поверхностно-активного вещества. После ресуспендирования клеток в клеточном разбавителе, отбирают часть суспензии и окрашивают мертвые клетки окрашивающим раствором АОPI. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью устройства для измерения клеток крови Cellometer Auto 2000 Cell Viability Counter (производимый Nexcelom Bioscience). На основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток, клетки корректируют с помощью клеточного разбавителя в соответствии с составом группы так, чтобы клеточный раствор можно было вводить в дозе 0,1 мл/массу тела. Клеточную суспензию после приготовления хранят в ледяной воде до введения.

[0100]

2) После быстрого размораживания криоконсервированных активированный интегрин  $\beta 7$  CAR-T в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в клеточном разбавителе и центрифугируют (800 x g, 5 мин, 4°C) для удаления поверхностно-активного вещества. После ресуспендирования клеток в клеточном разбавителе, отбирают часть суспензии и окрашивают мертвые клетки окрашивающим раствором АОPI. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью устройства для измерения клеток крови. На основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток, клетки корректируют с помощью клеточного разбавителя в соответствии с составом группы так, чтобы клеточный раствор можно было вводить в дозе 0,1 мл/массу тела. Клеточную суспензию после приготовления хранят в ледяной воде до введения.

[0101]

3) После быстрого размораживания криоконсервированных Контроль-T в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в клеточном разбавителе и центрифугируют (800 x g, 5 мин, 4°C) для удаления поверхностно-активного вещества. После ресуспендирования клеток в клеточном разбавителе, отбирают часть суспензии и окрашивают мертвые клетки красящим раствором АОPI. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью устройства для измерения клеток крови. На основании

результатов измерения количества жизнеспособных клеток, клетки корректируют с помощью клеточного разбавителя в соответствии с составом группы так, чтобы клеточный раствор можно было вводить в дозе 0,1 мл/массу тела. Клеточную суспензию после приготовления хранят в ледяной воде до введения.

[0102]

4) После быстрого размораживания криоконсервированных NY-ESO-1 TCRI-T на бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в клеточном разбавителе и центрифугируют (800 x g, 5 мин, 4°C) для удаления поверхностно-активного вещества. После ресуспендирования клеток в клеточном разбавителе, отбирают часть суспензии и окрашивают мертвые клетки красящим раствором АОPI. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью устройства для измерения клеток крови. На основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток, клетки корректируют с помощью клеточного разбавителя в соответствии с составом группы так, чтобы клеточный раствор можно было вводить в дозе 0,1 мл/массу тела. Клеточную суспензию после приготовления хранят в ледяной воде до введения.

[0103]

5) После быстрого размораживания криоконсервированных CD19 CAR-KHYG-1 и KHYG-1 в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в культуральной среде и центрифугируют (150 x g, 5 мин, 20°C) для удаления поверхностно-активных веществ. После ресуспендирования клеток в среде, все количество клеток высевают в колбы и культивируют при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После начала культивирования, морфологию и пролиферацию клеток наблюдают под микроскопом. Клетки культивируют до тех пор, пока клетки не дорастут до субконфлюэнтности. Суспензию субконфлюэнтных клеток пассируют в культуральные колбы, содержащие новую культуральную среду. Затем ту же операцию продолжают для размножения культуры. Клетки, необходимые для введения, сохраняют в течение периода тестирования.

В каждый день введения, каждую клеточную суспензию, культивированную до достижения субконфлюэнтности клеток, собирают в необходимом количестве и 3 раза промывают D-PBS (-)центрифугированием. Затем клетки ресуспендируют в бессывороточной среде RPMI1640. После ресуспендирования, отбирают часть клеточной суспензии и мертвые клетки окрашивают красящим раствором АОPI. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью устройства для измерения клеток крови. На основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток, клетки корректируют с помощью клеточного разбавителя в соответствии с составом группы так, чтобы суспензию клеток можно было вводить в дозе 0,1 мл/организм. Раствор для введения после приготовления хранят в ледяной воде до введения.

[0104]

## 1.2 Тестируемое вещество

### 1.2.1 Тестируемое вещество

Таблица 1

Название тестируемого вещества	Источник/производитель
Толинапант	Astex Pharmaceuticals
Биринапант	Medchemexpress
LCL161	Medchemexpress
AT406	MedKoo Biosciences

Толинапант: (+)-L-лактат соединения формулы (1) представлен только в примерах.

Условия хранения: в холодильнике, в защищенном от света месте

[0105]

### 1.2.2 Подготовка среды

В качестве основной среды для толинапанта используют дистиллированную воду, для биринапанта используют каптизол, для LCL161 используют ацетат натрия, для AT406 используют гипромеллозу.

Для каптизола, необходимое количество каптизола взвешивают, затем растворяют в дистиллированной воде и доводят до получения 12,5% раствора каптизола, который используют в качестве растворителя для биринапанта.

Для ацетата натрия, 0,1 М хлористоводородную кислоту добавляют к 3М натрий-ацетатному буферу (pH 5,2) до достижения pH 4,3-4,6, и полученную смесь используют в качестве растворителя для LCL161.

Для гипромеллозы, необходимое количество гипромеллозы взвешивают и затем растворяют в PBS для приготовления 1% раствора гипромеллозы. После растворения и автоклавирования добавляют и растворяли Tween 80 в количестве, эквивалентном 0,1%, и полученную смесь используют в качестве растворителя для AT406.

Все среды хранят в помещении с низкой температурой (установочная температура: 4°C) до приготовления лекарственного средства.

[0106]

### 1.2.3 Приготовление раствора для введения толинапанта

Толинапант готовят таким образом, чтобы толинапант можно было вводить в дозе 16 мг/кг, на основании опубликованных отчетов (ссылка 1: Mol Cancer Ther. 2018 July; 17(7): 1381-1391; и ссылка 2: Oncoimmunology, 2020 January 9; 9(1): 1710398). Толинапант взвешивают до количества, необходимого для достижения концентрации 1,6 мг/мл, и затем растворяют в дистиллированной воде до получения бесцветного прозрачного раствора. Полученный раствор для введения разливают в стерильные пробирки и криоконсервируют в светозащитных условиях до введения.

[0107]

### 1.2.4 Приготовление раствора для введения биринапанта

Биринапант готовят таким образом, чтобы его можно было назначать в дозе 12 мг/кг, на основании опубликованного отчета (ссылка 3: Jessica Michie et al., Cancer Immunol Res. 2019; 7(2): 183-192). Биринапант взвешивают до количества, необходимого для достижения концентрации 1,2 мг/мл, и затем суспендируют в заранее подготовленном



каптизоле. Суспензию готовят путем измельчения полученной смеси до получения однородной мелкодисперсной суспензии в агатовой ступке. Раствор для введения разливают в стерильные пробирки и хранят в низкотемпературной камере (установочная температура: 4°C) в условиях светозащиты до введения.

[0108]

#### 1.2.5 Приготовление раствора для введения LCL161

LCL161 готовят таким образом, чтобы LCL161 можно было вводить в дозе 30 мг/кг, на основании опубликованного отчета (ссылка 4: Peter J Houghton et al., *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 58(4): 636-639). LCL161 взвешивают до количества, необходимого для достижения концентрации 3 мг/мл, и затем растворяют в заранее приготовленном растворе ацетата натрия с образованием бесцветного прозрачного раствора. Полученный раствор для введения разливают в стерильные пробирки и хранят в низкотемпературной камере (установочная температура: 4°C) в условиях светозащиты до введения.

[0109]

#### 1.2.6 Приготовление раствора для введения AT406

AT406 готовят таким образом, чтобы AT406 можно было вводить в дозе 100 мг/кг, на основании опубликованного документа (ссылка 5: Melissa K Brunckhorst et al., *Cancer Biology & Therapy*. 2012; 13(9): 804-811). Сначала готовят раствор AT406 в ДМСО с концентрацией 200 мг/мл. Затем AT406 взвешивают до количества, необходимого для достижения концентрации 10 мг/мл, и суспендируют в заранее приготовленном растворе гипромеллозы. Суспензию готовят путем измельчения смеси до однородной мелкодисперсной суспензии в агатовой ступке. Раствор для введения разливают в стерильные пробирки и хранят в низкотемпературной камере (заданная температура: 4°C) в условиях светозащиты до введения.

[0110]

### 1.3 Тестовая система

#### 1.3.1 Используемая клетка

##### 1.3.1.1 NALM6-luc2

- 1) Название клеточной линии: NALM6-luc2
- 2) Происхождение: острый лимфобластный лейкоз
- 3) Источник: ATCC CRL-3273

После получения ATCC CRL-3273 создают линию клеток luc2.

4) Условия культивирования: среда RPMI1640, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) 10% фетальной бычьей сыворотки; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

- a) Культуральная жидкость: RPMI1640
  - i) Источник: Nacalai Tesque, Inc.
- b) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка
  - i) Концентрация: 10%
  - ii) Источник: Nichirei Biosciences Inc.

с) Добавка: смешанный раствор пенициллина-стрептомицина

i) Концентрации: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

ii) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

[0111]

#### 1.3.1.2 MM.1S-luc2

1) Название клеточной линии: MM.1S

2) Происхождение: множественная миелома

3) Источник: ATCC (После получения клетки создают клеточную линию luc2)

4) Условия культивирования: среда RPMI1640, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

a) Культуральная жидкость: RPMI1640

i) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

b) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка

i) Концентрация: 10%

ii) Источник: Sigma-Aldrich

с) Добавка: смешанный раствор пенициллина-стрептомицина

i) Концентрации: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина

ii) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

[0112]

#### 1.3.1.3 A375

1) Название клеточного штамма: A375

2) Происхождение: злокачественная меланома

3) Источник: ATCC CRL-1619

4) Условия культивирования: среда DMEM, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C, 30 мин) фетальной бычьей сыворотки; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

a) Культуральная среда: DMEM

i) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

b) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка

i) Концентрация: 10%

ii) Источник: Sigma-Aldrich

с) Добавка: смешанный раствор пенициллина-стрептомицина

и) Концентрация: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина

ii) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

[0113]

#### 1.3.1.4 NALM6

1) Название клеточной линии: NALM6

2) Происхождение: острый лимфобластный лейкоз

3) Источник: ATCC CRL-3273

4) Условия культивирования: среда RPMI1640, содержащая 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки; CO<sub>2</sub> инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

a) Культуральная жидкость: RPMI1640

i) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

b) Сыворотка: фетальная бычья сыворотка

i) Концентрация: 10%

ii) Источник: Sigma-Aldrich

c) Добавка: смешанный раствор пенициллина-стрептомицина

i) Концентрация: 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг /мл стрептомицина

ii) Источник: Nacalai Tesque, Inc.

[0114]

### 1.3.2 Животное

1) Вид/штамм: мышь/NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$ KO Jic (NOG)

2) Микробиологическая степень: без специфических патогенов (SPF)

3) Источник: In-Vivo Science Inc.

4) Возраст в неделях (на момент поступления): 6 недель

5) Условия размножения

Животных выращивают в окружающей среде со следующими условиями:

a) температура: 23±3°C

b) влажность: 55±15%

c) освещение: светлое время: с 8:00 до 20:00

темное время: с 20:00 до 8:00

d) пища и вода: в свободном доступе, CL-2 (твердый корм, стерилизованный радиацией, производства CLEA Japan, Inc.), автоклавированная водопроводная вода

[0115]

### 1.3.3 Состав группы

#### 1.3.3.1 Комбинация антагониста IAP и CD19 CAR-T

Состав группы в каждом тесте следующий.

Таблица 2: Комбинированный тест с бирнапантом

Группа	Дозировка и		Дозировка и		Количество	Самец или самка
	Введение 1	введение для введения 1	Введение 2	введение для введения 2		
1	-	-	-	-	5	♀
2	Бирнапант	12 мг/кг, q3-4d, в/б	-	-	5	♀
3	CD19 CAR-T	1x10 <sup>5</sup> клеток/ организм,	-	-	5	♀

4	CD19 CAR-T	в/в 1x10 <sup>6</sup> клеток/ организм,	-	-	5	♀
5	Биринапант	в/в 12 мг/кг, q3-4d, в/б	CD19 CAR-T	1x10 <sup>5</sup> клеток/ организм, в/в	5	♀

Таблица 3: Комбинированный тест с толинапантом

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка и введение для введения 2	Количество п	Самец или самка
1	-	-	-	-	5	♀
2	Толинапант	16 мг/кг, qd, п/о	-	-	5	♀
3	CD19 CAR-T	1x10 <sup>5</sup> клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀
4	CD19 CAR-T	1x10 <sup>6</sup> клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀
5	Толинапант	16 мг/кг, qd, п/о	CD19 CAR-T	1x10 <sup>5</sup> клеток/ организм, в/в	5	♀

Таблица 4. Комбинированный тест с толинапантом при небольшом объеме опухоли<sup>a</sup>

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка и введение для введения 2	Количество п	Самец или самка
1	-	-	-	-	5	♀
2	Толинапант	16 мг/кг, qd,	-	-	5	♀

		п/о					
		2x10 <sup>4</sup>					
3	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀	
		1x10 <sup>5</sup>					
4	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀	
		1x10 <sup>6</sup>					
5	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀	
							2x10 <sup>4</sup>
6	Толинапант	16 мг/кг, qd, п/о	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	5	♀	
				1x10 <sup>5</sup>			
7	Толинапант	16 мг/кг, qd, п/о	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	5	♀	

<sup>a</sup> «Низкий объем опухоли» относится к оценочному тесту комбинации лекарственных средств, начиная с объема прививки опухоли, который составляет приблизительно одну десятую объема традиционной системы оценки (количество люминесценции приблизительно 2×10<sup>6</sup> фотонов/сек).

Таблица 5: Комбинированный тест LCL161 и AT406

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка и введение для введения 2	Количество п	Самец или самка
1	-	-	-	-	5	♀
2	LCL161	30 мг/кг, qw, п/о	-	-	5	♀
3	AT406	100 мг/кг, qd, п/о	-	-	5	♀
4	CD19 CAR-	1x10 <sup>5</sup>	-	-	5	♀

	T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^6$				
5	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в	-	-	5	♀
6	LCL161	30 мг/кг, qw, п/о	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	5	♀
7	AT406	100 мг/кг, qd, п/о	CD19 CAR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	5	♀

[0116]

1.3.3.2 Комбинация антагониста IAP и активированного интегрин  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T)

Состав группы в этом тесте следующий.

Таблица 6: Комбинированный тест с толипапантом

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка и введение для введения 2	Количество п	Самец или самка
1	-	-	-	-	5	♀
2			Толипапант	16 мг/кг, pd, п/о	5	♀
3	Контроль-T	$3 \times 10^4$ клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	-	-	5	♀
4	Контроль-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	-	-	5	♀
5	aITGB7	$3 \times 10^4$	-	-	5	♀

	CAR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$				
6	aITGB7 CAR-T	клеток/ организм, в/в $3 \times 10^4$	-	-	5	♀
7	Контроль-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	Толинапант	16 мг/кг, рд, п/о	5	♀
8	Контроль-T	клеток/ организм, в/в $3 \times 10^4$	Толинапант	16 мг/кг, рд, п/о	5	♀
9	aITGB7 CAR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	Толинапант	16 мг/кг, рд, п/о	5	♀
10	aITGB7 CAR-T	клеток/ организм, в/в	Толинапант	16 мг/кг, рд, п/о	5	♀

[0117]

1.3.3.3 Комбинация антагониста IAP и NY-ESO-1-TCR-T

Состав группы в этом тесте следующий.

Таблица 7: Комбинированный тест с толинапантом

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка	Количество п	Самец или самка
				и введение для введения 2		
1	-	-	-	-	5	♀
2	Толинапант	16 мг/кг, рд, п/о	-	-	5	♀
3	-	-	NY-ESO-1	$3 \times 10^6$	5	♀

			TCR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^7$		
4	-	-	NY-ESO-1 TCR-T	клеток/ организм, в/в $3 \times 10^6$	5	♀
5	Толинапант	16 мг/кг, pd, п/о	NY-ESO-1 TCR-T	клеток/ организм, в/в $1 \times 10^5$	5	♀
6	Толинапант	16 мг/кг, pd, п/о	NY-ESO-1 TCR-T	клеток/ организм, в/в	5	♀

[0118]

1.3.3.4 Комбинация антагониста IAP и CD19 CAR-KHYG-1

Состав группы в этом тесте следующий.

Таблица 8: Комбинированный тест с толинапантом

Группа	Введение 1	Дозировка и введение для введения 1	Введение 2	Дозировка и введение для введения 2	Количество	Самец или самка
1	-	-	-	-	5	♀
2			Толинапант	16 мг/кг, pd, п/о $1 \times 10^7$ клеток/ организм,	5	♀
3	KHYG-1	в/о, день 0, 4, 7, 11 $1 \times 10^7$ клеток/ организм,	-	-	5	♀
4	CD19 CAR-KHYG-1	в/о, день 0, 4, 7, 11	-	-	5	♀



5	КНУГ-1	1x10 <sup>7</sup> клеток/ организм, в/о, день 0, 4, 7, 11	Толинапант	16 мг/кг, pd, п/о	5	♀
6	CD19 CAR- КНУГ-1	1x10 <sup>7</sup> клеток/ организм, в/о, день 0, 4, 7, 11	Толинапант	16 мг/кг, pd, п/о	5	♀

в/о: внутриопухолевая инъекция

[0119]

### 1.3.4 Обоснование дозировки и схемы введения

#### 1.3.4.1 Толинапант

Дозировку и введение толинапанта устанавливают на основе дозировки и введения, которые продемонстрировали эффективность на мышах с ксенотрансплантатом клеточной линии рака молочной железы человека MDA-MB-231, обычно используемых в тестах на антагонисты IAP (16 мг/кг, ежедневное пероральное введение) (ссылки 1 и 2). Также подтверждают, что эта система тестирования NALM6-luc2 не показывает эффективность в той же схеме.

[0120]

#### 1.3.4.2 Биринапант

Дозировку и способ введения биринапанта устанавливают на основании статьи о комбинации CAR-T и биринапанта (ссылка 3) (12 мг/кг, внутривенное введение два раза в неделю). Также подтверждают, что эта система тестирования NALM6-luc2 не показывает эффективность в той же схеме.

[0121]

#### 1.3.4.3 LCL161

Дозировку и способ введения LCL161 устанавливают со ссылкой на самую низкую дозу, указанную в опубликованном отчете (30 мг/кг, пероральное введение два раза в неделю) (ссылка 4). Подтверждают, что при пероральном введении этой системы тестирования NALM6-luc2 в количестве 30 мг/кг два раза в неделю не наблюдается никаких эффектов, и по меньшей мере половина мышей гибнет. Поэтому дозировку и введение снижают до перорального введения один раз в неделю (30 мг/кг, пероральное введение один раз в неделю).

[0122]

#### 1.3.4.4 AT406

На основании дозировки и введения, при которых в опубликованных документах

сообщалось об эффективности в мышинной системе ксенотрансплантата клеточной линии рака молочной железы человека OVCAR и мышинной системе ксенотрансплантата клеточной линии рака молочной железы человека MDA-MB-231, устанавливая максимальную дозу без прекращения приема лекарственного средства (100 мг/кг, ежедневное пероральное введение) (ссылка 5; ссылка 6: Qian Cai et al. Med Chem. 2011; 54(8): 2714-2726). Также подтверждают, что эта система тестирования NALM6-luc2 не показывает эффективность в той же схеме.

[0123]

#### 1.3.4.5 CD19 CAR-KHYG-1 и KHYG-1

В фармакологическом тесте Ev CAR-KHYG-1 с использованием KHYG-1 на мышинной модели подкожной опухоли клеточной линии глиобластомы, фармацевтическую композицию вводят интратуморально в дозе  $1 \times 10^7$  клеток/организм два раза в неделю (всего 3 раза) (ссылка 7: Nakazawa T et al., Anticancer Res. 2020; 40(6): 3231-3237). В FOLR1 CAR-KHYG-1 с помощью клеточной линии рака желудка, интратуморальное введение осуществляют один раз в неделю (всего два раза) (ссылка 8: Minsung Kim et al., PLoS One. 2018; 13(6): e0198347).

[0124]

### 1.4 Способ тестирования

#### 1.4.1 Способ тестирования комбинации антагониста IAP и CD19 CAR-T

Получают 6-недельных мышей NOG, произведенных In-Vivo Science Co., Ltd., и опухолевые клетки интравенно трансплантируют мышам в возрасте 7 недель для получения мышей с опухолями. За день до трансплантации, интратуморально вводят бусульфекс (BSF) в дозе 20 мг/кг. В период размножения, мышей содержат по 5 мышей на группу и разводят в помещении для разведения P2A с температурой 24°C (фактическое измерение: от 19,7 до 25,0°C), влажностью 50% (фактическое измерение: от 38,6 до 58,5%) и освещением 12 часов в день (с 8:00 до 20:00). В период размножения, мышам предоставлен свободный доступ к стерилизованному радиацией твердому корму для мышей (CL-2, производства Clea Japan, Inc.) и стерилизованной в автоклаве водопроводной воде, помещенной в бутылку для воды.

CD19 CAR-T-клетки вводят интравенно однократно в соответствии с составом группы в день разделения на группы. Антагонист IAP также начинают вводить в день разделения на группы и вводят перорально или интравенно в соответствии с таблицей состава группы.

Период оценки устанавливают 3-4 недели. Деление на группы и фармакологическую оценку проводят на основании значений люминесценции опухоли, определенных IVIS (торговая марка). Измерение величины люминесценции с помощью IVIS (торговая марка) и измерение массы тела проводят два раза в неделю.

[0125]

#### 1.4.2 Способ тестирования комбинации антагониста IAP и активированного интегрин $\beta 7$ CAR-T

Получают 6-недельных мышей NOG, произведенных In-Vivo Science Co., Ltd., и опухолевые клетки внутривенно трансплантируют мышам в возрасте 7 недель для получения мышей с опухолями. Каждую мышь идентифицируют номером, прикрепленным к хвосту мыши. В период размножения, мышей содержат по 5 мышей на группу и разводят в помещении для разведения с температурой 24°C (фактическое измерение: от 19,7 до 25,0°C), влажностью 50% (фактическое измерение: от 38,6 до 58,5%) и освещением 12 часов в день (с 8:00 до 20:00). В период размножения, мышам предоставлен свободный доступ к стерилизованному радиацией твердому корму для мышей (CL-2, производства Clea Japan, Inc.) и стерилизованной в автоклаве водопроводной воде, помещенной в бутылку для воды.

Контрольные Т-клетки и активированный интегрин  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T) клетки вводят внутривенно однократно в соответствии с таблицей состава группы в день разделения на группы. Толинапант также начинают в день разделения на группы и вводят перорально каждый день в соответствии с таблицей состава группы.

Период оценки устанавливают до 14 дня или 21 дня. Деление на группы и фармакологическую оценку проводят с помощью значений люминесценции опухоли, определенных с помощью IVIS, в качестве индикатора. Величину люминесценции, определенную с помощью IVIS, и массу тела измеряют два раза в неделю.

[0126]

#### 1.4.3 Способ тестирования комбинации антагониста IAP и NY-ESO-1 TCR-T

Получают 6-недельных мышей NOG, произведенных In-Vivo Science Co., Ltd., и опухолевые клетки внутривенно трансплантируют мышам в возрасте 7 недель для получения мышей с опухолями. Каждую мышь идентифицируют номером, прикрепленным к хвосту мыши. В период размножения, мышей содержат по 5 мышей на группу и разводят в помещении для разведения с температурой 23°C, влажностью 55% и освещением 12 часов/день (с 8:00 до 20:00). В период размножения, мышам предоставлен свободный доступ к стерилизованному радиацией твердому корму для мышей (CL-2, производства Clea Japan, Inc.) и стерилизованной в автоклаве водопроводной воде, помещенной в бутылку для воды.

NY-ESO-1 TCR-T-клетки вводят внутривенно один раз в соответствии с таблицей состава группы в день разделения на группы. Толинапант также начинают вводить в день деления на группы и вводят перорально в соответствии с таблицей состава группы.

Период оценки устанавливают 2 недели, и разделение на группы и фармакологическую оценку проводят на основании результатов измерения диаметра опухоли с помощью штангенциркуля. Диаметр опухоли и массу тела измеряют два раза в неделю.

[0127]

#### 1.4.4 Способ одновременного тестирования антагониста IAP и CD19 CAR-KHYG-1

Получают 6-недельных мышей NOG, произведенных In-Vivo Science Co., Ltd., и опухолевые клетки внутривенно трансплантируют мышам в возрасте 7 недель для

получения мышей с опухолями. Каждую мышь идентифицируют номером, прикрепленным к хвосту мыши. В период размножения, мышей содержат по 5 мышей на группу и разводят в помещении для разведения с температурой 24°C (фактическое измерение: от 19,7 до 25,0°C), влажностью 50% (фактическое измерение: от 38,6 до 58,5%) и освещением 12 часов в день (с 8:00 до 20:00). В период размножения, мышам предоставлен свободный доступ к стерилизованному радиацией твердому корму для мышей (CL-2, производства Clea Japan, Inc.) и стерилизованной в автоклаве водопроводной воде, помещенной в бутылку для воды.

После разделения на группы, клетки CD19 CAR KHYG-1 и клетки KHYG-1 вводят внутриопухолево всего 4 раза в соответствии с составом группы. Толинапант также начинают в день разделения на группы и вводят перорально каждый день в соответствии с таблицей состава группы.

Период оценки устанавливают до 17 дня. Разделение на группы и фармакологическую оценку проводят, используя результаты измерения объема опухоли с помощью штангенциркуля в качестве индикатора. Измерение объема опухоли и измерение массы тела проводят два раза в неделю и перед каждым введением.

[0128]

#### 1.4.1 Подготовка среды для культивирования

##### 1.4.1.1 Приготовление среды RPMI1640

50 мл инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки и 5 мл антибиотика добавляют к 500 мл культуральной среды RPMI 1640, и полученную среду используют в качестве культуральной среды. С другой стороны, для клеток KHYG-1 и клеток CD19 CAR-KHYG-1, в качестве культуральной среды используют среду, дополнительно содержащую IL-2 в конечной концентрации 100 Ед/мл. Каждую среду хранят в низкотемпературной камере (установочная температура: 4°C) до использования.

[0129]

##### 1.4.1.2 Приготовление среды DMEM

К 500 мл среды DMEM добавляют 50 мл инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 мин) фетальной бычьей сыворотки и 5 мл антибиотика. Полученную среду хранят в низкотемпературной камере (установленная температура: 4°C) до использования.

[0130]

#### 1.4.2 Приготовление клеточных суспензий для трансплантации

##### 1.4.2.1 Приготовление суспензий клеток NALM6-luc2, MM.1S-luc2 и NALM6 для трансплантации

Культивирование клеток осуществляют с помощью культуральной среды, называемой ниже «средой»), в CO<sub>2</sub> инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). После быстрого размораживания криоконсервированной клеточной линии в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в среде и центрифугируют (150 x g, 5 мин,

20°C) для удаления суспензии. Клетки ресуспендируют в среде, и все количество клеток высевают в колбу и культивируют при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. После начала культивирования, морфологию и пролиферацию клеток наблюдают под микроскопом. Клетки культивируют до достижения субконфлюэнтности (первый пассаж). Суспензию субконфлюэнтных клеток пассируют в культуральную колбу, содержащую новую среду (второй пассаж). После размораживания, клетки, пассированные 3 раза или более, используют для трансплантации. Объем пассируемой культуральной жидкости составляет от 1/10 до 1/3 объема жидкости новой культуральной среды.

Клеточную суспензию, культивированную до субконфлюэнтности, трижды промывают D-PBS (-) путем центрифугирования и затем ресуспендируют в бессывороточной RPMI 1640.

Для NALM6-luc2, после ресуспендирования отбирают часть клеточной суспензии, мертвые клетки окрашивают красящим раствором АОPI и подсчитывают количество жизнеспособных клеток с помощью устройства для измерения клеток крови. Клеточную суспензию готовят путем разведения клеток RPMI 1640 до  $1 \times 10^7$  клеток/мл на основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток в клетках. Аналогично, в системе с небольшим объемом опухоли, готовят клеточную суспензию путем разведения клеток бессывороточной RPMI 1640 до достижения концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

Для MM.1S-luc2, после ресуспендирования отбирают часть клеточной суспензии, мертвые клетки окрашивают красящим раствором АОPI и подсчитывают количество жизнеспособных клеток с помощью устройства для измерения клеток крови. Клеточную суспензию готовят путем разведения клеток RPMI 1640 до  $3 \times 10^7$  клеток/мл на основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток в клетках.

Для NALM6, после ресуспендирования отбирают часть клеточной суспензии, мертвые клетки окрашивают красящим раствором АОPI и подсчитывают количество жизнеспособных клеток с помощью устройства для измерения клеток крови. Клеточную суспензию готовят путем разведения клеток RPMI 1640 до  $1 \times 10^8$  клеток/мл на основании результатов измерения количества жизнеспособных клеток. Приготовленную клеточную суспензию смешивают в равном количестве с матригелем в качестве каркаса (торговая марка: Corning, матрица базальной мембраны высококонцентрированного матригеля) с получением конечной суспензии для трансплантации ( $5 \times 10^7$  клеток/мл).

Клеточные суспензии после приготовления хранят в ледяной воде до трансплантации.

[0131]

#### 1.4.2.2 Приготовление суспензии клеток A375 для трансплантации

Культивирование клеток осуществляют в CO<sub>2</sub> инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) с помощью культуральной среды (называемой ниже «культурой»). После быстрого размораживания криоконсервированной клеточной линии A375 в бане с постоянной температурой 37°C, клетки суспендируют в среде и центрифугируют (150 x g, 5 мин, 20°C) для удаления суспензии. После ресуспендирования клеток в среде, все количество клеток

высевают на чашку и культивируют при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. После начала культивирования, морфологию и пролиферацию клеток наблюдают под микроскопом, и клетки культивируют до тех пор, пока клетки не вырастут до субконфлюэнтности (первый пассаж). После удаления супернатанта из субконфлюэнта в чашке и промывания D-PBS(-) (производства Nacalai Tesque, Inc.), добавляют трипсин-ЭДТК-PBS(-) (производства Nacalai Tesque Inc.) и клетки отделяют и собирают, и затем центрифугируют (4°C, 1200 об/мин, 5 мин). Клетки суспендируют в среде DMEM и подсчитывают количество жизнеспособных клеток с помощью раствора для окрашивания АОPI. Клетки высевают с плотностью клеток, подходящей для размера чашки, и культивируют в CO<sub>2</sub> инкубаторе (второй пассаж). Клетки, пассированные 3 раза и более, используют для трансплантации.

Используя трипсин-ЭДТК-PBS(-), культивируемые клетки отделяют и собирают, и затем центрифугируют (4°C, 1200 об/мин, 5 мин). После удаления супернатанта, добавляют D-PBS(-), клетки ресуспендируют и промывают центрифугированием таким же образом, как указано выше. Эту операцию промывания далее повторяют дважды. После отбора части клеточной суспензии и подсчета количества жизнеспособных клеток с помощью окрашивающего раствора АОPI, суспензию клеток в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл готовят с помощью D-PBS(-). После приготовления, суспензию клеток хранят на льду до трансплантации.

[0132]

#### 1.4.3 Трансплантация

##### 1.4.3.1 Трансплантация NALM6-Luc2

После фиксации мышей с помощью фиксатора, клеточную суспензию трансплантируют из расчета  $1 \times 10^6$  клеток/0,1 мл/организм с помощью 27G Муjector (1 мл, производства Terumo Corporation) в хвостовую вену каждой мыши без анестезии. В системе с малым объемом опухоли, трансплантируют клеточную суспензию из расчета  $1 \times 10^5$  клеток/0,1 мл/организм.

[0133]

##### 1.4.3.2 Трансплантация MM.1S-luc2

После фиксации мышей с помощью фиксатора, клеточную суспензию трансплантируют из расчета  $3 \times 10^6$  клеток/0,1 мл/организм в хвостовую вену каждой мыши без анестезии с помощью 27G Муjector (1 мл, производства Terumo Corporation).

[0134]

##### 1.4.3.3 Трансплантация A375

В группе подкожной трансплантации, для облегчения операции по трансплантации и последующего наблюдения за ростом опухоли, место трансплантата (правая подмышечная область) бреют безопасной бритвой за день до трансплантации опухоли. Для подготовки мышей с опухолями, суспензию клеток трансплантируют в количестве  $1 \times 10^6$  клеток/0,1 мл/организм в подмышечную подкожную клетчатку мышей без анестезии с помощью инсулинового шприца с иглой 26G (1 мл, Terumo Corporation).

[0135]

#### 1.4.3.4 Трансплантация NALM6

В группе подкожной трансплантации, для облегчения операции по трансплантации и последующего наблюдения за ростом опухоли, место трансплантата (правая подмышечная область) бреют безопасной бритвой за день до трансплантации опухоли. Для подготовки мышей с опухолями, суспензию клеток трансплантируют в количестве  $5 \times 10^6$  клеток/0,1 мл/организм в подмышечную подкожную клетчатку мышей без анестезии с помощью инсулинового шприца с иглой 26G (1 мл, Terumo Corporation).

[0136]

#### 1.4.4 Разделение на группы

##### 1.4.4.1 Разделение на группы после трансплантации NALM6-Luc2

В соответствии со схемой дозирования, показанной на Фиг. 6, NALM6-luc2 трансплантируют на следующий день после обработки клеток бусульфексом. На третий день после трансплантации измеряют значения люминесценции с помощью системы визуализации IVIS (торговая марка) Lumina X5 In-Vivo (производства PerkinElmer, Co., Ltd.). Используя значения яркости в качестве индикатора, и используя программное обеспечение SAS R9.4 (разработанное SAS Institute Japan), мышей делят на группы по 5 мышей в каждой методом стратифицированной случайной выборки.

[0137]

##### 1.4.4.2 Разделение на группы после трансплантации MM.1S-luc2

Согласно схеме дозирования, показанной на Фиг. 9, на седьмой день после трансплантации измеряют значения люминесценции с помощью системы визуализации IVIS (торговая марка) Lumina X5 In-Vivo (производства PerkinElmer, Co., Ltd.). Используя значения люминесценции в качестве индикатора, и используя программное обеспечение SAS R9.4 (производство SAS Institute Japan), мышей делят на группы по 5 мышей в каждой методом стратифицированной случайной выборки. После разделения на группы, особей идентифицируют по маркировке на хвосте каждой мыши.

[0138]

##### 1.4.4.3 Разделение на группы после трансплантации A375

На восьмой день после трансплантации, измеряют длинный диаметр и короткий диаметр и рассчитывают объем опухоли. Используя программное обеспечение SAS R9.4 (производство SAS Institute Japan) и размер опухоли в качестве индикатора, мышей делят на группы по 5 мышей в каждой методом стратифицированной случайной выборки. После группировки особей идентифицируют по маркировке на хвосте каждой мыши.

[0139]

##### 1.4.4.4 Разделение на группы после трансплантации NALM6

На 21 день после трансплантации, измеряют длинный и короткий диаметры и рассчитывают объем опухоли. Используя программное обеспечение SAS R9.4 (производство SAS Institute Japan) и размер опухоли в качестве индикатора, мышей делят на группы по 5 мышей в каждой методом стратифицированной случайной выборки. После группировки особей идентифицируют по маркировке на хвосте каждой мыши.

[0140]

#### 1.4.5 Способ введения

1) Суспензию CD19 CAR-T-клеток вводят в хвостовую вену во время деления на группы. Для дозировки подсчитывают количество жизнеспособных CD19 CAR-T-клеток, и суспензию клеток, приготовленную в соответствии с таблицей состава групп, вводят один раз в дозе 0,1 мл/организм. Для введения используют шприц Муjector с иглой 27G.

[0141]

2) Суспензию активированный интегрин  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T) клеток и суспензию контрольных T-клеток вводят в хвостовую вену во время разделения на группы. Для дозировки подсчитывают количество жизнеспособных aITGB7 CAR-T клеток. Клеточную суспензию, приготовленную в соответствии с таблицей состава группы, вводят один раз в дозе 0,1 мл/организм. Для введения используют шприц Муjector с иглой 27G.

[0142]

3) Суспензию TCR-T-клеток NY-ESO-1 вводили в хвостовую вену. Для дозировки подсчитывали количество жизнеспособных TCR-T-клеток NY-ESO-1 и суспензию клеток, доведенную до плотности клеток в соответствии с таблицей состава группы, вводили один раз в дозе 0,1 мл/организм. Для введения использовали шприц Муjector с иглой 27G.

[0143]

4) Для раствора для введения клеток KHYG-1 и раствора для введения клеток CD19 CAR-KHYG-1 подсчитывают количество жизнеспособных клеток и готовят суспензию клеток с плотностью клеток, скорректированной в соответствии с таблицей состава группы, и вводят ее внутриопухолево дважды в неделю по 0,1 мл/организм (всего 4 раза). Для введения используют шприц Муjector с иглой 27G.

[0144]

5) Биринапант вводят внутрибрюшинно в дозе 10 мл/кг согласно таблице состава группы. Толинапант, LCL161 и AT406 вводят перорально в дозе 10 мл/кг согласно таблице состава группы с помощью зонда таким же образом. Для внутрибрюшинного введения, вместо зонда используют инсулиновый шприц с иглой 26G. При пероральном введении, вместо зонда для введения каждого лекарственного средства используют иглу.

[0145]

#### 1.4.6 Измерение опухоли

##### 1.4.6.1 Измерение величины люминесценции опухоли (фотоны/сек)

VivoGlo™-люциферин (производства Promega) растворяют в D-PBS(-) до концентрации 30 мг/мл и затем криоконсервируют при  $-20^{\circ}\text{C}$  в светозащитных условиях. В день измерения, растворенный VivoGlo™-люциферин разводят эквивалентным количеством D-PBS(-) и хранят при комнатной температуре в светозащитных условиях до использования для тестирования. Исходя из заранее измеренной массы тела, внутрибрюшинно вводят VivoGlo™-люциферин в объеме 10 мл/кг. Через 20 минут после введения измеряют величину люминесценции опухоли с помощью системы визуализации



IVIS (торговая марка). Для измерения, используют IVIS (торговая марка) Lumina X5. На Фиг. 1-5 и 7, общий поток [п/с] по оси ординат указывает значения люминесценции опухоли (фотоны/сек).

[0146]

#### 1.4.6.2 Измерение диаметра опухоли

Диаметр опухоли определяют путем измерения короткого диаметра и длинного диаметра с помощью электронного штангенциркуля (производства Mitutoyo Corporation). После трансплантации опухолевых клеток, диаметр опухоли измеряют два раза в неделю.

[0147]

#### 1.4.6.3 Измерение объема опухоли

На основании результатов измерения диаметра опухоли рассчитывают объем опухоли (TV: объем опухоли) по следующей формуле:

$$TV=L \times W^2 \times 1/2$$

в которой

TV: объем опухоли (мм<sup>3</sup>)

L: длинный диаметр (мм)

W: короткий диаметр (мм)

[0148]

#### 1.4.7 Масса тела

Массу тела измеряют в день разделения на группы и день вскрытия, и дважды в неделю в течение периода введения.

[0149]

#### 1.5 Критерии оценки

Величина люминесценции опухоли или объем опухоли

Масса тела

Изменение массы тела

[0150]

#### 1.6 Способ статистического анализа

Для каждого элемента данных, сводную статистику (среднее и стандартное отклонение и стандартную ошибку) рассчитывают спомощью Microsoft Excel 2013. Данные со статистическим анализом выполняют с помощью программного обеспечения SAS R9.4 (SAS Institute Japan). Значимость определяют как  $p < 0,05$ .

[0151]

## 2. Результаты

### 2.1 Тест для комбинации антагониста IAP и CD19 CAR-T

#### 2.1.1 Тест для комбинации биринапанта и CD19 CAR-T

По сравнению с только CD19 CAR-T, комбинация биринапанта и CD19 CAR-T не увеличивает противоопухолевые эффекты (Фиг. 1).

[0152]

#### 2.1.2 Тест для комбинации толинапанта и CD19 CAR-T

При комбинированном применении толинапанта и CD19 CAR-T, значительный комбинированный эффект наблюдается на 7 день и далее. Когда  $1 \times 10^5$  клеток CD19 CAR-T используют в комбинации с толинапантом, на 14 день наблюдают эффект, эквивалентный эффекту, достигнутому при использовании только  $1 \times 10^6$  клеток CD19 CAR-T, и наблюдают лучшую регрессию опухоли на 14 день и далее (Фиг. 2).

[0153]

### 2.1.3 Тест для комбинации толинапанта и Cd19 Car-T при небольшом объеме опухоли

При комбинированном применении толинапанта и CD19 CAR-T наблюдают сильный комбинированный эффект. При использовании  $1 \times 10^5$  клеток CD19 CAR-T в комбинации с толинапантом, на 17 день наблюдают эффект, эквивалентный эффекту, достигнутому при использовании только  $1 \times 10^6$  клеток CD19 CAR-T. При использовании  $2 \times 10^4$  клеток CD19 CAR-T в комбинации с толинапантом, эффект, эквивалентный эффекту, достигнутому при использовании только  $1 \times 10^6$  клеток CD19 CAR-T, наблюдают на 21 день. Результаты показывают, что существует вероятность того, что эта комбинация позволяет достичь по меньшей мере 50-кратного снижения количества CAR-T-клеток (Фиг. 3).

[0154]

### 2.1.4 Тест для комбинации CD19 CAR-T, LCL161 и AT406

Когда LCL161 и CD19 CAR-T используют в комбинации, значительный комбинированный эффект наблюдают на 7 день и далее. Однако, поскольку LCL161 является высоко токсичным, по меньшей мере половина животных погибает из-за LCL161. Когда  $1 \times 10^5$  клеток CD19 CAR-T используют в комбинации с LCL161, эффект, эквивалентный эффекту, достигаемому при использовании только  $1 \times 10^6$  клеток CD19 CAR-T, наблюдают на 14 день и далее. Что касается наивысшей эффективности, то эффективность, достигаемая при комбинированном применении LCL161, ниже эффективности, достигаемой при комбинированном применении толинапанта (Фиг. 4).

С другой стороны, когда AT406 и CD19 CAR-T используют в комбинации, комбинированный эффект наблюдают на 10 день и далее. При использовании  $1 \times 10^5$  клеток CD19 CAR-T в комбинации с AT406 эффект, эквивалентный эффекту, достигаемому при использовании только  $1 \times 10^6$  клеток CD19 CAR-T, наблюдают на 14 день и далее (Фиг. 5).

[0155]

### 2.2 Тест на толинапант и активированный интегрин $\beta 7$ CAR-T (aITGB7 CAR-T)

Толинапант и  $3 \times 10^4$  клеток aITGB7 CAR-T используют в комбинации, и их комбинированный эффект оценивают в течение 21 дня. Наблюдают значительный комбинированный эффект. В группе, которой вводят только  $3 \times 10^4$  клеток aITGB7 CAR-T, противоопухолевые эффекты начинают проявляться на 14 день и далее. Напротив, когда  $3 \times 10^4$  клеток aITGB7 CAR-T комбинируют с толинапантом, регрессию опухоли четко наблюдают на 11 день и далее, и наблюдают значительный синергетический эффект (Фиг.

7).

[0156]

2.3 Тест на комбинацию толинапанта и NY-ESO-1 TCR-T

Что касается объема опухоли на 15 день, значительную разницу наблюдают между группой, которой вводят комбинацию  $3 \times 10^6$  клеток/организм NY-ESO-1 TCR-T и толинапанта, и группами, которым вводят только либо NY-ESO-1 TCR-T, либо толинапант. Более высокий противоопухолевый эффект наблюдают в группе, которой вводят только  $1 \times 10^7$  клеток/организм NY-ESO-1 TCR-T, чем в группе, которой вводят только  $3 \times 10^6$  клеток/организм NY-ESO-1 TCR-T; и на 7 день и далее, объем опухоли уменьшается до уровня ниже, чем в день 0. Однако в группе, которой одновременно вводят NY-ESO-1 TCR-T и толинапант, подтверждают более высокую степень регрессии опухоли и наблюдают синергические эффекты на основе комбинированного применения.

[0157]

2.4 Тест для комбинации толинапанта и CD19 CAR-KHYG-1

Толинапант и CD19 CAR-KHYG-1 применяют в комбинации, и эффект их комбинации оценивают в течение 17 дней. Наблюдают значительный комбинированный эффект. Когда CD19 CAR-KHYG-1 или толинапант вводят отдельно, противоопухолевые эффекты не наблюдают. Напротив, когда эти два лекарственных средства применяют в комбинации, эффект подавления пролиферации четко виден на 7 день и далее, и значительные комбинированные эффекты наблюдают на 17 день (Фиг. 9).

[0158]

3. Заключение

Когда антагонист IAP, такой как толинапант, вводят отдельно, никакого эффекта на NALM6 (B-ALL) и MM.1S (MM) не наблюдают. Напротив, значимых, высоковоспроизводимых результатов достигают при комбинированной активности толинапанта+CD19 CAR-T, толинапанта+активированный интегрин  $\beta 7$  CAR-T (aITGB7 CAR-T), толинапанта+NY-ESO-1 TCR-T и толинапанта+CD19 CAR-KHYG-1. Другие антагонисты IAP, такие как AT406 и LCL161, также демонстрируют комбинированный эффект с CD19 CAR-T; однако LCL161 демонстрирует такую токсичность, что подтверждается потеря веса и смерть. Что касается также максимального эффекта, комбинация с толинапантом является превосходной. Впоследствии, хотя AT406 демонстрирует профиль комбинированного эффекта, аналогичный профилю толинапанта, скорость проявления эффекта отличается. Соответственно, с точки зрения AUC, достигаемой при комбинированном применении, и максимального объема опухоли (значения люминесценции), толинапант и AT406 пытаются дифференцировать друг от друга. Анализ показывает, что с точки зрения AUC в данных комбинации до 17 дня можно наблюдать значимость, обусловленную комбинированным применением толинапанта. Аналогичные результаты получают и на 14 день (Таблицы 9 и 10). С точки зрения максимального объема опухоли также можно получить значительную разницу между толинапантом и AT406а (Таблица 11).

Вышеуказанные результаты подтверждают, что комбинация с толинапантом обеспечивает более высокий эффект повышения эффективности лекарственного средства, чем комбинации с любым другим антагонистом IAP. Это позволяет предположить, что толинапант также является значительно превосходящим по эффекту повышения эффективности лекарственного средства, достигаемому при комбинированном применении с модифицированными иммунными клетками, такими как CAR-T-клетки, TCR-T-клетки или CAR-NK-клетки.

Также подтверждено, что когда CAR-T, использованные в этом примере, взаимодействуют с опухолевой клеткой-мишенью, экспрессирующей антиген CAR (например, CD19-положительный NALM6) *in vitro*, продуцируется цитокин (например, TNF- $\alpha$ ). Кроме того, подтверждено, что когда цитокин, продуцируемый CAR-T, присутствует вместе с толинапантом, гибель клеток (например, апоптоз) индуцируется как в антиген-отрицательных опухолевых клетках (например, CD19-отрицательных NALM6), так и в антиген-экспрессирующих клетках. Ожидается, что такая бесконтактная индукция апоптоза опухолевых клеток окажет противоопухолевое действие на опухолевые клетки, в которых произошло избегание антигена, или опухолевые клетки, метастазировавшие в участок, к которому модифицированные иммунные клетки не могут получить доступ.

[0159]

Таблица 9: t-тест с использованием AUC в качестве индикатора (17 день)

	AT406	LCL161	Биринапант
Толинапант	<0,05	<0,05	<0,05

[0160]

Таблица 10: t-тест с использованием AUC в качестве индикатора (14 день)

	AT406	LCL161	Биринапант
Толинапант	<0,05	<0,05	<0,05

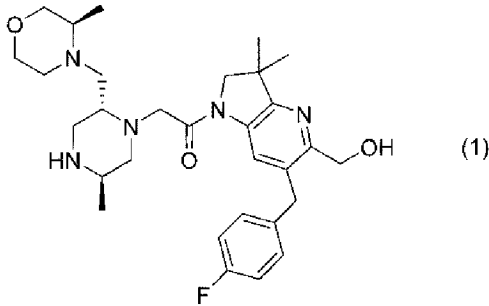
[0161]

Таблица 11: t-тест с использованием максимального объема опухоли в качестве индикатора

	AT406	LCL161	Биринапант
Толинапант	<0,05	<0,05	<0,05

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

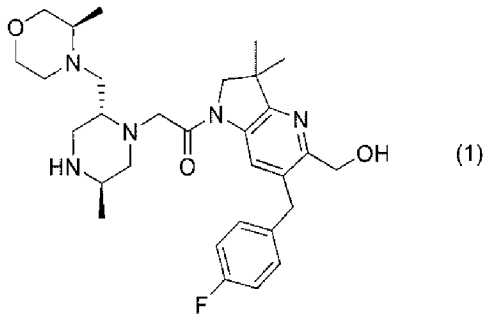
1. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, представленное формулой (1):



его фармацевтически приемлемую соль, или его фармацевтически приемлемый сольват, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора,

где фармацевтическую композицию вводят в комбинации с соединением, представленным следующей формулой (1):



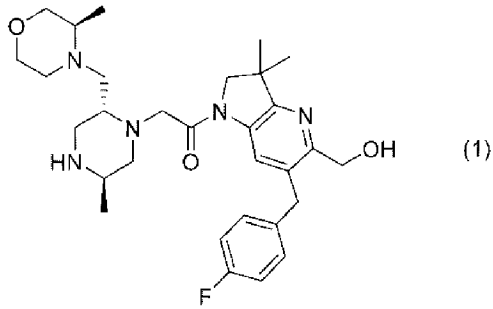
его фармакологически приемлемой солью, или его фармакологически приемлемым сольватом.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, интегрин  $\beta 7$  и NY-ESO-1.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где химерный антигенный рецептор или рекомбинантный Т-клеточный рецептор специфически распознает активированный интегрин  $\beta 7$ .

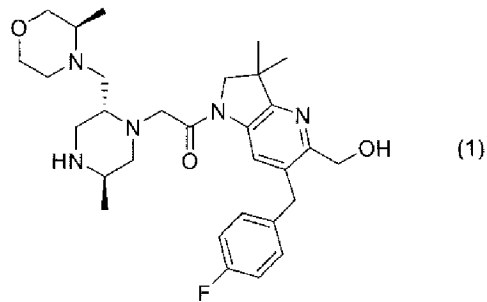
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, и химерный антигенный рецептор содержит (1) внеклеточный домен, способный распознавать антиген,

- (2) трансмембранный домен,
  - (3) внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы, и
  - (4) внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .
6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где внеклеточный домен способен распознавать CD19 или интегрин  $\beta$ 7.
7. Фармацевтическая композиция по п. 5 или 6, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.
8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 5-7, где костимулирующая молекула представляет собой CD2, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) или CD278 (ICOS).
9. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора; и рекомбинантный Т-клеточный рецептор имеет вариабельный домен, способный распознавать NY-ESO-1.
10. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где иммунная клетка представляет собой
- Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19,
- Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает интегрин  $\beta$ 7,
- НК-клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора, который специфически распознает CD19, или
- Т-клетку, модифицированную для экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора, который специфически распознает NY-ESO-1.
11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10 для применения в профилактике и/или лечении рака.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, где соединение, представленное формулой (1), его фармацевтически приемлемую соль или его фармацевтически приемлемый сольват вводят в дозе от 10 до 180 мг/день.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, где иммунную клетку вводят в дозе от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  клеток (количество жизнеспособных клеток)/кг массы тела/день.
14. Набор, содержащий первый агент и второй агент, где первый агент содержит соединение, представленное формулой (1):



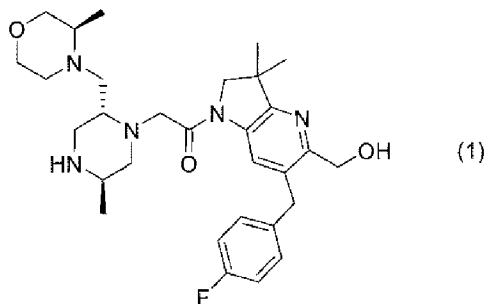
его фармакологически приемлемую соль, или его фармацевтически приемлемый сольват, и второй агент содержит иммунную клетку, модифицированную для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

15. Способ профилактики и/или лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в профилактике и/или лечении рака соединения, представленного формулой (1):



его фармакологически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемого сольвата, в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

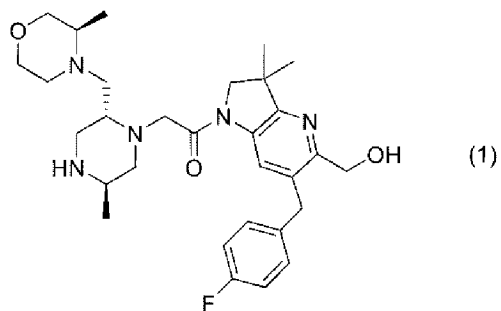
16. Применение соединения, представленного формулой (1)



его фармакологически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемого сольвата при приготовлении лекарственного средства для введения в комбинации с иммунной клеткой, модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора.

17. Применение иммунной клетки, модифицированной для экспрессии химерного

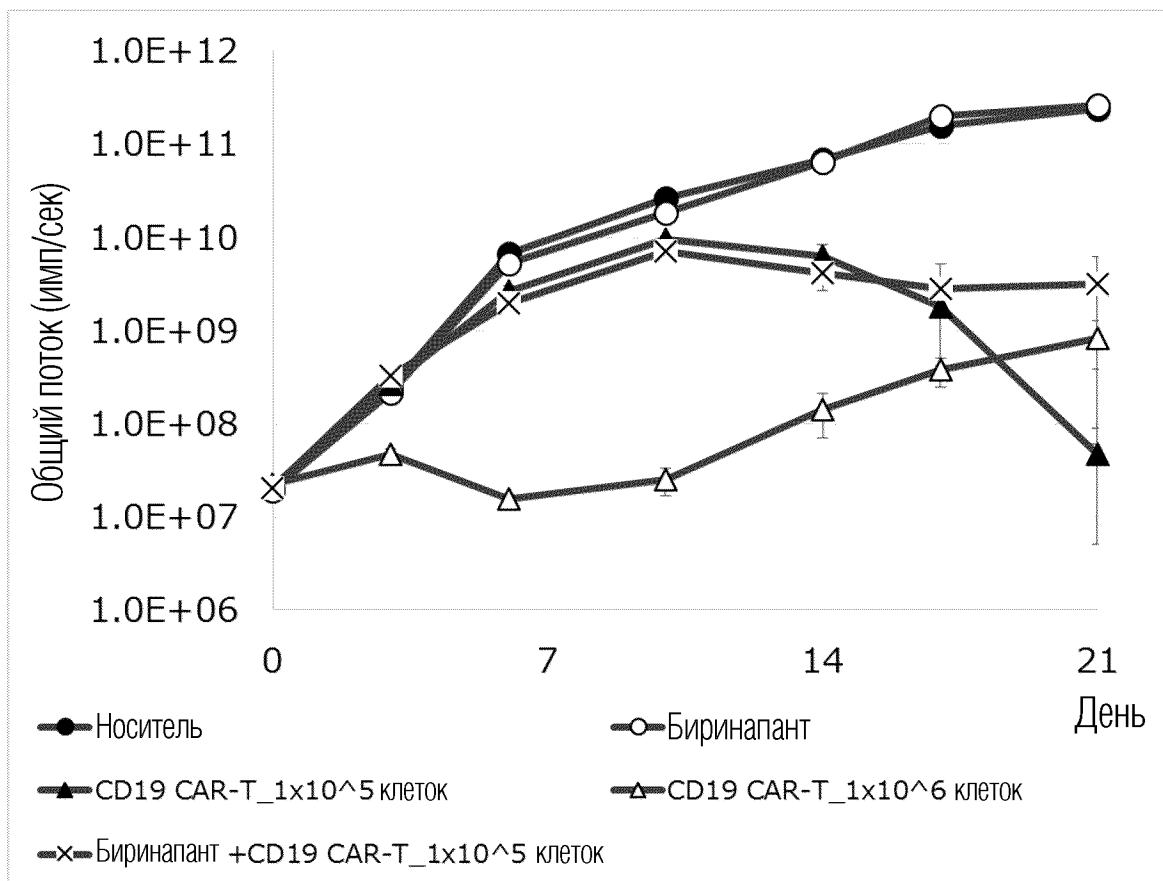
антигенного рецептора или рекомбинантного Т-клеточного рецептора, при приготовлении лекарственного средства для введения в комбинации с соединением, представленным формулой (1):



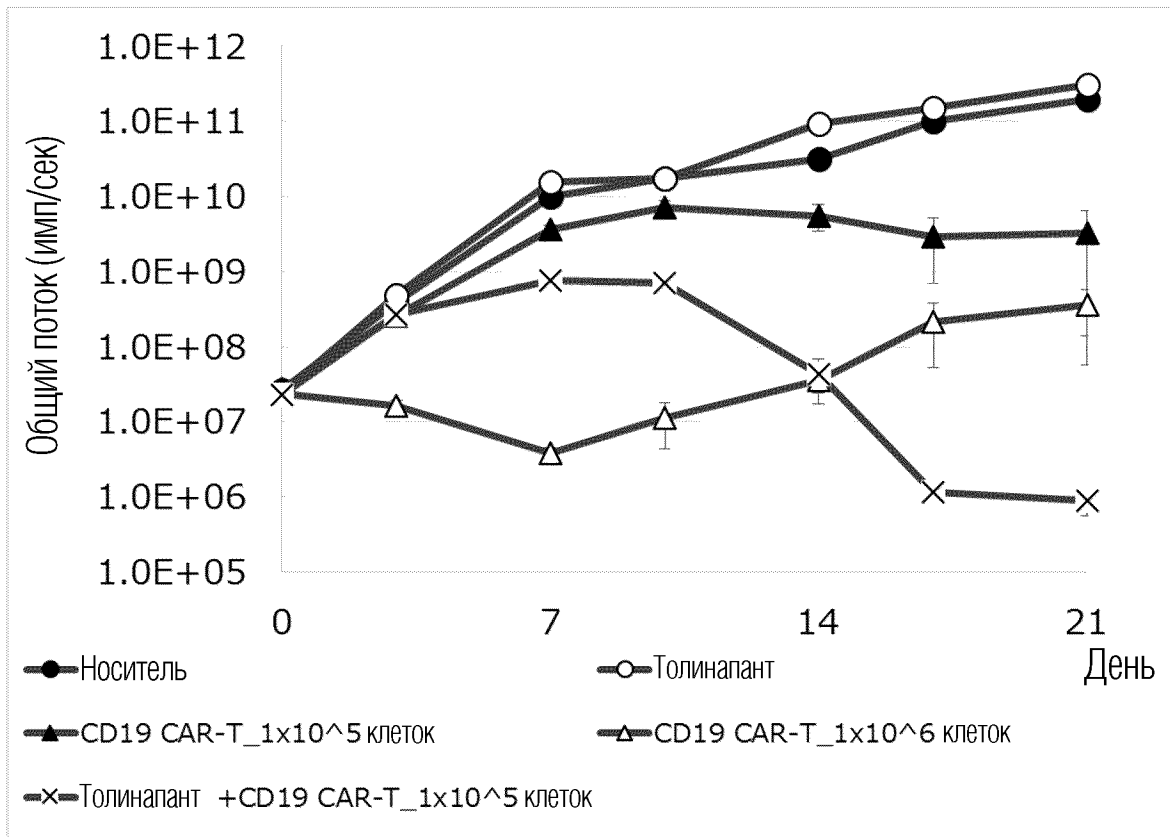
его фармакологически приемлемой солью, или его фармацевтически приемлемым сольватом.



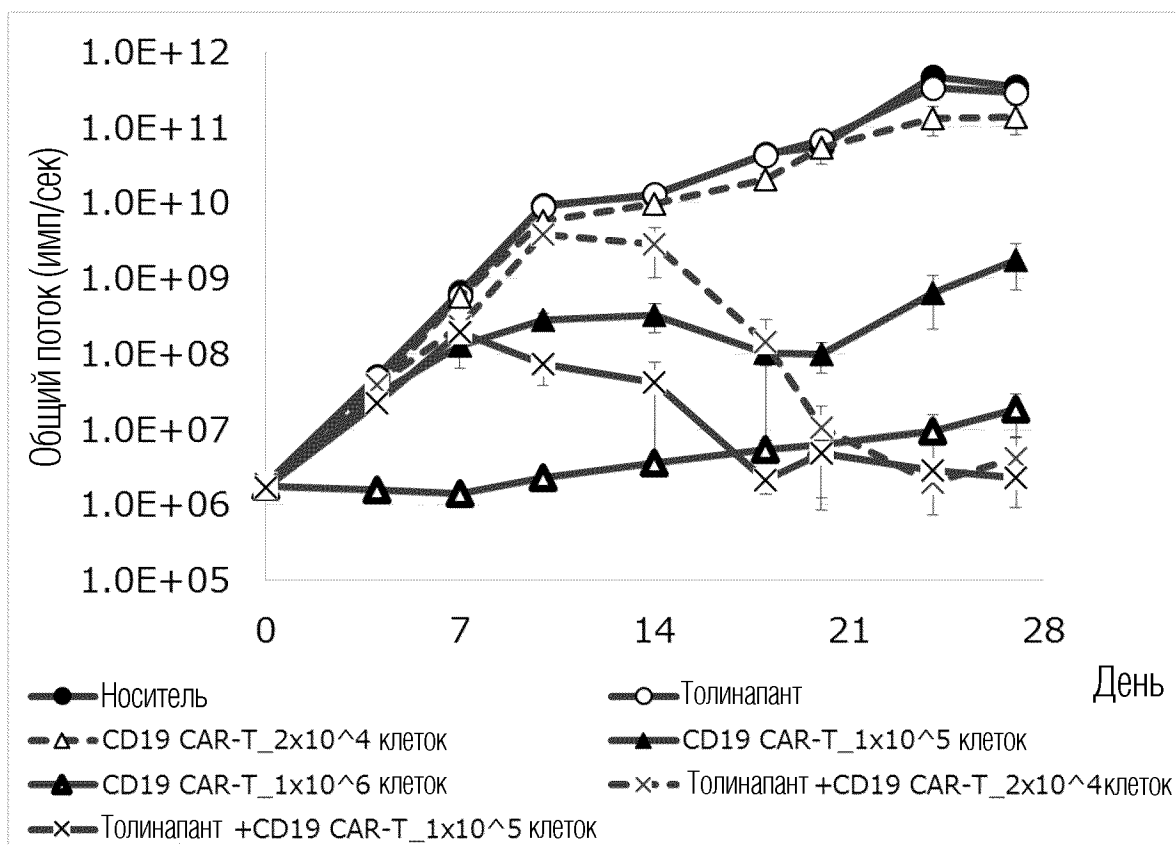
ФИГ. 1



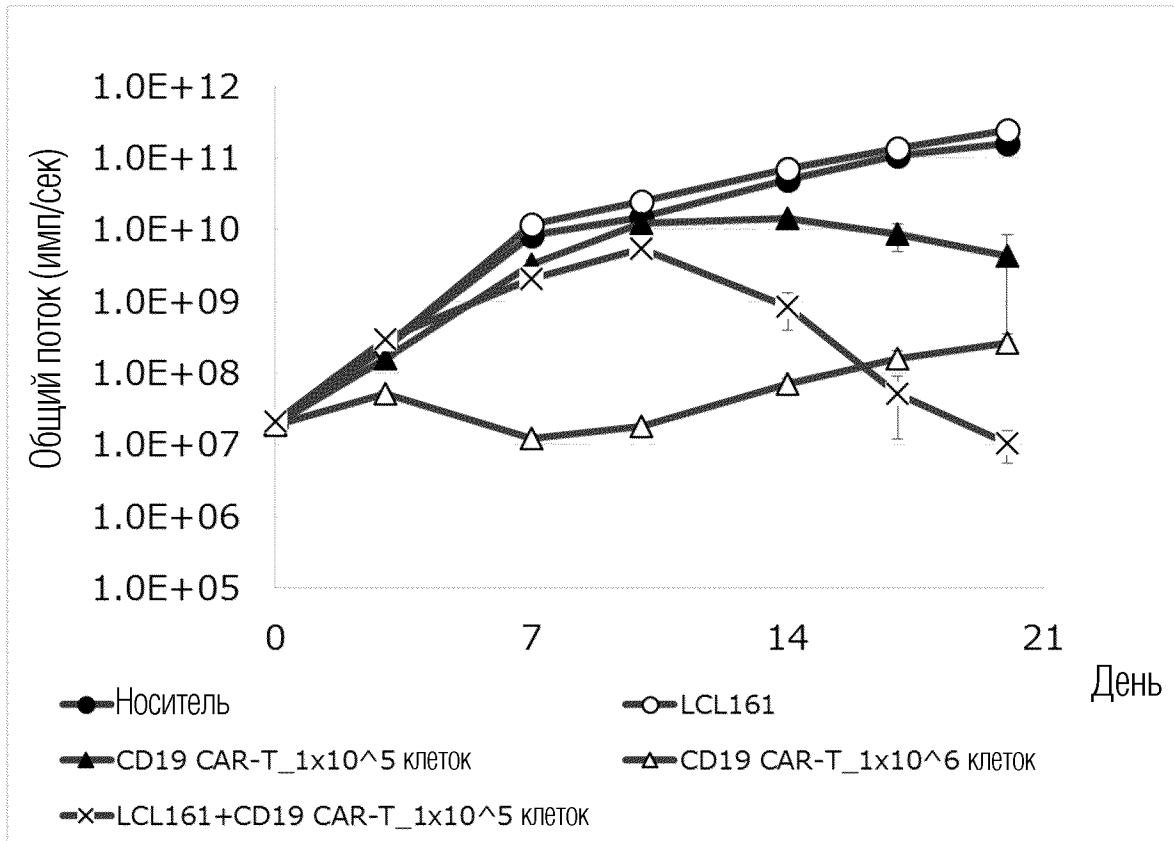
ФИГ. 2



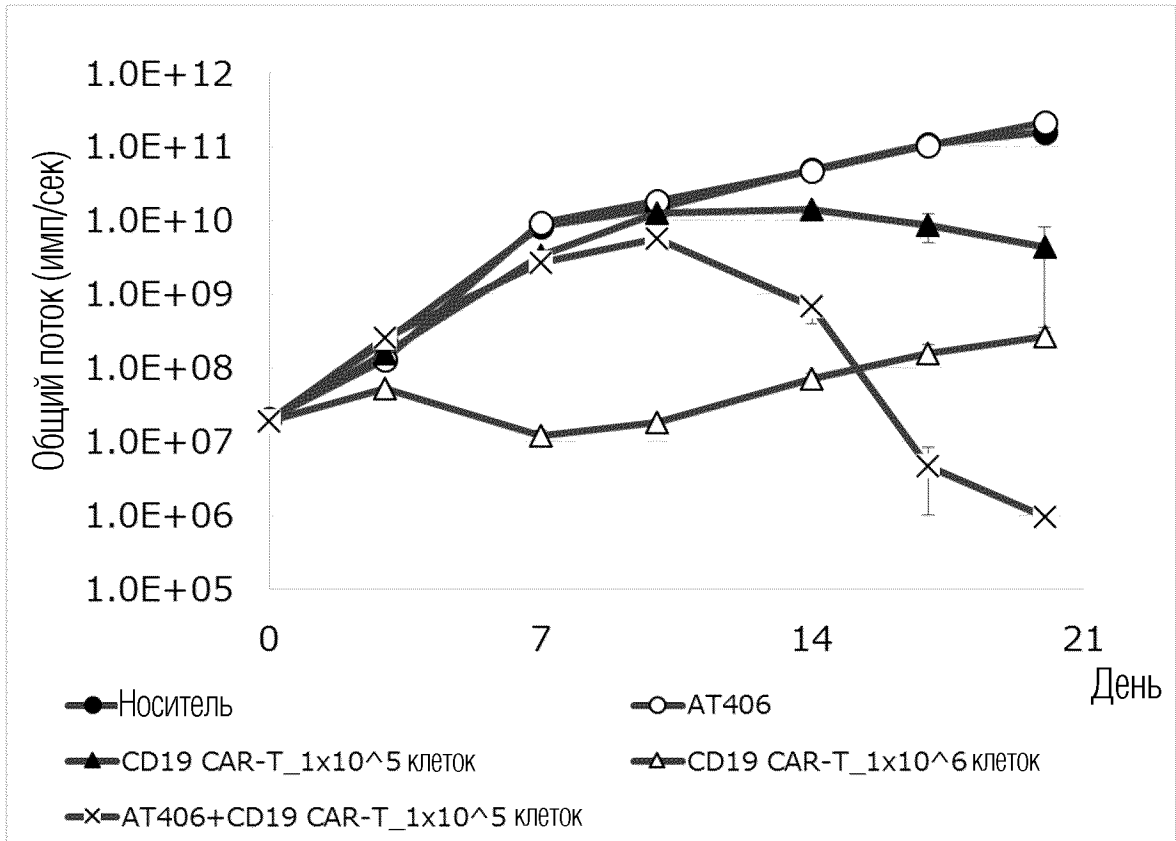
ФИГ. 3



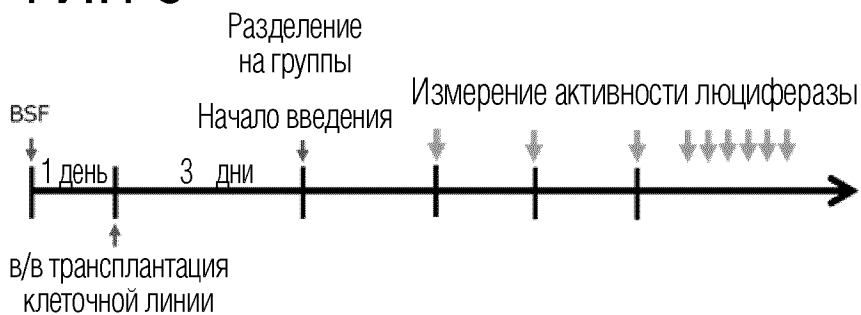
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

