

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291329** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.07.25

(22) Дата подачи заявки
2020.10.30

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ
АНТИТЕЛО К CD19 И ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТКИ**

(31) 19206479.8

(32) 2019.10.31

(33) EP

(86) PCT/EP2020/080494

(87) WO 2021/084063 2021.05.06

(71) Заявитель:
МОРФОСИС АГ (DE)

(72) Изобретатель:

Энделль Ян, Боксхаммер Райнер,
Претшер Доминик (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение направлено на комбинированную терапию, включающую антитело к CD19 или его фрагмент антитела и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки) для применения при лечении лейкоза или лимфомы.

202291329

A1

A1

202291329

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574169EA/032

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ АНТИТЕЛО К CD19 И ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТКИ

Область техники изобретения

Настоящее изобретение направлено на комбинированную терапию, включающую антитело к CD19 или его фрагмент антитела и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки) для применения при лечении лейкоза или лимфомы.

Уровень техники

CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 95-кДа из надсемейства иммуноглобулинов, содержащий два внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена и длинный цитоплазматический хвост. Белок представляет собой поверхностный рецептор, присутствующий на всех В-лимфоцитах и массово экспрессируемый, начиная с ранних стадий развития предшественника В-клеток и далее до снижения его количества в ходе конечной дифференцировки в плазматические клетки. Указанный рецептор является специфическим для линий В-лимфоцитов и не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках и других иммунных клетках, за исключением некоторых фолликулярных дендритных клеток. CD19 действует как позитивный регулятор передачи сигналов В-клеточного рецептора (BCR) и играет важную роль в активации и пролиферации В-клеток, а также в развитии гуморальных иммунных ответов. Совместно с CD21 и CD81 он выступает в роли костимулирующей молекулы и имеет решающее значение для В-клеточных ответов на Т-зависимые антигены. Цитоплазматический хвост CD19 структурно ассоциирован с семейством тирозинкиназ, которые индуцируют нисходящие сигнальные пути с помощью Src-семейства белков тирозинкиназ. CD19 является привлекательной мишенью для опухолей лимфоидного происхождения из-за своей высокой экспрессии при всех хронических лимфоцитарных лейкозах (CLL) и неходжкинских лимфомах (NHL), а также при многих других различных видах лейкозов, включая острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и волосатоклеточный лейкоз (HCL).

Тафаситамаб (прежние названия: MOR00208 и XmAb[®]5574) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое нацелено на антиген CD19, представляющий собой трансмембранный белок, участвующий в передаче сигнала через В-клеточный рецептор. Тафаситамаб был сконструирован в Fc-области IgG для усиления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), тем самым улучшив ключевой механизм лизиса опухолевых клеток и обеспечив возможность повышенной эффективности по сравнению с обычными антителами, т. е. антителами без усиления. Тафаситамаб изучали или изучают в настоящее время в нескольких клинических исследованиях, таких как исследования CLL, ALL и NHL. В некоторых из тех исследований тафаситамаб применяли в комбинации с иделалисибом, леналидомидом или венетоклаксом.

Несмотря на недавние открытия и разработки нескольких противораковых агентов, из-за плохого прогноза для многих типов рака, включая опухоли, экспрессирующие CD19, все еще существует потребность в оптимизированном способе или терапевтическом агенте для лечения таких типов рака. Соответственно, авторы настоящего изобретения подтвердили, что комбинированное введение $\gamma\delta$ Т-клеток и антитела или фрагмента антитела, специфичного в отношении CD19, характеризуется превосходной эффективностью при лечении злокачественных лимфом В-клеточного происхождения, и завершили настоящее изобретение.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предлагается новая комбинация для применения в лечении рака, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19 и $\gamma\delta$ Т-клеток.

Между тем с момента их открытия в 1980-х годах было признано, что $\gamma\delta$ Т-клетки играют важную роль в развитии инфекционного процесса, а также злокачественных новообразований, таких как рак. Активированные $\gamma\delta$ Т-клетки обладают мощными цитотоксическими и широкими способностями к распознаванию опухолей, не зависящими от молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), присутствующих на их клетках-мишенях. Кроме того, было продемонстрировано, что $\gamma\delta$ Т-клетки являются мощными медиаторами антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). На сегодняшний день продемонстрировано, что противоопухолевый эффект $\gamma\delta$ Т-клеток может быть существенно усилен антителами анти-CD20 (Tokuyama et al. 2008; Hoeres et al. 2018). Более того, Fc-усиленное антитело к CD20 обинутузумаб демонстрирует повышенное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с не-усиленными Fc антителами, такими как ритуксимаб, в сочетании с $\gamma\delta$ Т-клетками.

Однако активность антител, специфичных к другим поверхностным антигенам, кроме CD20, относительно уничтожения опухолевых клеток в присутствии $\gamma\delta$ Т-клеток еще не оценивалась. Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение альтернативной комбинированной терапии, которая включает антитело и $\gamma\delta$ Т-клетки.

Для достижения вышеуказанной цели в настоящем изобретении предлагается комбинация для применения в лечении рака, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19 и $\gamma\delta$ Т-клеток.

В настоящем изобретении авторы скомбинировали $\gamma\delta$ Т-клетки с антителами, нацеленными на CD19, тафаситамабом (с Fc-усилением) и Xmab5603 (без Fc-усиления) и оценили их противоопухолевую активность в отношении образцов CLL, MCL и В-ALL, полученных от пациентов, а также различные клеточные линии лимфомы и лейкоза в анализах ADCC. В целом наблюдалась повышенная скорость лизиса клеток при комбинировании $\gamma\delta$ Т-клеток с Fc-усиленным антителом анти-CD19 тафаситамабом по сравнению с не усиленным Fc антителом Xmab5603 или антителом IgG1 отрицательного контроля.

Таким образом, было показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой

перспективную популяцию эффекторных клеток в терапии опухолей на основе антител, что было продемонстрировано в этом исследовании для Fc-усиленного антитела, нацеленного на CD19, тафаситамаба. Тафаситамаб продемонстрировал сильную противоопухолевую активность, опосредованную $\gamma\delta$ Т-клетками, в отношении нескольких клеточных линий лимфомы и лейкоза, а также первичных клеток CLL, MCL и BALL, полученных от пациентов, и может стать перспективным подходом к терапии лимфомы и лейкоза.

$\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из любых подходящих аутологичных или аллогенных $\gamma\delta$ Т-клеток или их популяции. В некоторых вариантах осуществления подходящие $\gamma\delta$ Т-клетки для применения в качестве источника описанных в данном документе $\gamma\delta$ Т-клеток включают клетки V δ 1, клетки V δ 2, клетки V δ 3, клетки V δ 5 и клетки V δ 8. Например, в настоящем изобретении предлагаются способы выделения и размножения клеток V δ 1 из некроветворной ткани, такой как кожа или кишечник. Например, клетки V δ 1 можно выделить из биоптатов кожи человека, как описано в документе US 2018/0312808, который полностью включен в данный документ посредством ссылки и конкретно для способов выделения клеток V δ 1 из ткани.

В других вариантах осуществления подходящие $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из крови (например, периферической крови). Способы выделения и размножения клеток V δ 1 из крови включают способы, описанные, например, в патенте США № 9 499 788 и публикации международного патента № WO 2016/198480, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Также Т-клетки V γ 9V δ 2 можно выделять из периферической крови и далее культивировать *ex vivo*. Культивирование V γ 9V δ 2 Т-клеток можно оптимизировать при наличии ИЛ-2 и золедроновой кислоты (ZOL). Способы выделения и размножения V γ 9V δ 2 Т-клеток из крови включают способы, описанные, например, в Hoeges et al. 2018.

В некоторых вариантах осуществления подходящие $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из опухолевой ткани (например, инфильтрирующие опухоль $\gamma\delta$ Т-клетки). В альтернативном варианте подходящие $\gamma\delta$ Т-клетки, которые могут быть сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеливающей конструкции, можно получить из некроветворной ткани в соответствии со способами, описанными ниже. Эти клетки можно культивировать в присутствии одного или большего количества факторов (например, агонистов TCR, агонистов корцепторов и/или цитокинов, например, ИЛ-4, ИЛ-15 и/или IFN- γ) в газопроницаемых биореакторных мешках до 21 дня и более. Варианты этого способа и другие способы получения Т-клеток V δ 1 являются пригодными для применения как часть настоящего изобретения. Например, полученные из крови Т-клетки V δ 1 можно альтернативно получать с помощью способов, описанных, например, в международных патентных публикациях WO 2017/197347 и WO 2016/081518 (публикация патента США № 2016/0175338), которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-

дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1, содержащую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2, содержащую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), и область HCDR3, содержащую последовательность GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LCDR1, содержащую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2, содержащую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и область LCDR3, содержащую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6) для применения при лечении рака.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-область SYVMH (SEQ ID NO: 1), HCDR2-область NPYNDG (SEQ ID NO: 2), HCDR3-область GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3) и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-область RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), LCDR2-область RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), LCDR3-область MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6) для применения при лечении рака.

В другом аспекте антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, содержит переменную область тяжелой цепи EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYYGTRVFDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 7),

и переменную область легкой цепи

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 8).

В другом аспекте антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, обладает эффекторной функцией. В другом аспекте антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, обладает усиленной эффекторной функцией. В одном варианте осуществления эффекторная функция представляет собой ADCC. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, обладает повышенной ADCC-активностью. В другом осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в положениях S239 и/или I332, при этом нумерация соответствует EU-индексу, как по Kabat.

В еще одном аспекте антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, содержит константную область тяжелой цепи

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9).

В еще одном аспекте антитело, специфичное в отношении CD19, содержит константную область легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 10).

В еще одном аспекте антитело, специфичное в отношении CD19, содержит константную область тяжелой цепи

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9) и

константную область легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 10).

В еще одном аспекте антитело, специфичное в отношении CD19, содержит область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11) и

область легкой цепи

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки содержат обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток включает несконструированные или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки и/или их смеси. В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую комбинацию, содержащую антитело, специфичное в отношении CD19, и обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток для применения при лечении рака.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки содержат несконструированные или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки и/или их смеси. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию несконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток. В еще одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови, опухолевой ткани или негемопозитической ткани. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток, выделенных из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток, выделенных из периферической крови, при этом $V\gamma9V\delta2$ Т-клетки культивировали *ex vivo* в присутствии ИЛ-1 и золедроновой кислоты (ZOL).

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом указанный рак представляет собой гематологический рак. В одном варианте осуществления указанный гемобластоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL) или острый лимфобластный лейкоз (ALL). В другом варианте осуществления указанный гемобластоз представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL). В других вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы из лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом антитело, специфичное в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят раздельно.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом антитело, специфичное в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят одновременно.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается набор для применения при лечении рака, содержащий антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Репрезентативные ADCC-анализы MOR00208 при увеличивающихся соотношениях эффектора к клетке-мишени (E:T). Результаты специфического лизиса, выраженные в % погибших клеток-мишеней, опосредованного MOR00208 (черный) или отрицательным контролем IgG1 (белый) и $\gamma\delta$ Т-клетками от здоровых доноров, изображены для трех линий клеток-мишеней Mino, Daudi и Jeko. Были протестированы четыре различных соотношения E:T от 0,7:1 до 20:1.

Фиг. 2. Репрезентативные ADCC-анализы MOR00208 при увеличивающихся соотношениях эффектора к клетке-мишени (E:T). Результаты специфического лизиса, выраженные в % погибших клеток-мишеней, опосредованного MOR00208 (черный) или контрольным IgG1 (белый) и $\gamma\delta$ Т-клетками от здоровых доноров, изображены для трех линий клеток-мишеней U2932 и REN. Были протестированы четыре различных соотношения E:T от 0,7:1 до 20:1.

Фиг. 3: Репрезентативные ADCC-анализы MOR00208 при увеличивающихся соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T) с применением первичных опухолевых клеток от двух пациентов с CLL и одного пациента с B-ALL в качестве клеток-мишеней. Результаты специфического лизиса, выраженные в % погибших клеток-мишеней, опосредованного MOR00208 (черный) или контрольным IgG1 (белый) и $\gamma\delta$ Т-клетками от здоровых доноров, изображены для трех экспериментов с применением первичных опухолевых клеток в качестве клеток-мишеней. Были протестированы четыре различных соотношения E:T от 0,7:1 до 20:1.

Фиг. 4 Репрезентативные ADCC-анализы MOR00208 при увеличивающихся соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T) с применением первичных опухолевых клеток от двух пациентов с MCL в качестве клеток-мишеней. Результаты специфического лизиса, выраженные в % погибших клеток-мишеней, опосредованного MOR00208 (черный) или контрольным IgG1 (белый) и $\gamma\delta$ Т-клетками от здоровых доноров, изображены для трех экспериментов с применением первичных опухолевых клеток в качестве клеток-мишеней. Были протестированы четыре различных соотношения E:T от 0,7:1 до 20:1.

Определения

Термин «**CD19**» обозначает белок, известный как CD19 и имеющий следующие синонимы: В4, В-лимфоцитарный антиген CD19, В-лимфоцитарный поверхностный антиген В4, CVID3, дифференцировочный антиген CD19, MGC12802 и Т-клеточный поверхностный антиген Leu-12.

Человеческий CD19 имеет аминокислотную последовательность:

MPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE
SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVN
VEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPC
LPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLSGVPDPSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKD
DRPARDMWVMEETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTG
GWKVS AVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQ
YGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPPEEEE
GEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENE
DEELTQPVARTMDFLSPHGS AWDP SREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPN
HEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR (SEQ ID NO: 13)

Термины «**MOR00208**» и «**XmAb 5574**» и «**тафаситамаб**» применяются в качестве синонимов антитела анти-CD19 в соответствии с Таблицей 1. В Таблице 1 представлены аминокислотные последовательности MOR00208/тафаситамаб. Антитело MOR00208 описано в заявке на патент США с серийным номером 12/377 251, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В заявке на патент США с серийным номером 12/377 251 описывается антитело, именуемое 4G7 H1.52 гибрид S239D/I332E/4G7 L1.155 (позже названное MOR00208 и тафаситамаб).

Термин «**антитело**» в контексте настоящего документа обозначает белок, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, который взаимодействует с антигеном. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (в данном документе называется сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (в данном документе называется сокращенно VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая из областей VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминокислотного конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, и FR4. Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Термин «антитело» включает в себя, например, моноклональные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжьи антитела и химерные антитела.

Антитела могут представлять собой любой изотип (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класс (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) или подкласс. Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на участки структурной и функциональной гомологии.

Фраза «**фрагмент антитела**» в контексте настоящего документа обозначает одну или больше количество частей антитела, которые создают возможность специфически взаимодействовать с антигеном (например, посредством связывания, стерического затруднения, стабилизирующего пространственного распределения). Примеры связывающих фрагментов включают в себя, помимо прочего, Fab-фрагмент, представляющий собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена VH, и выделенную гипервариабельную область (CDR). Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с помощью рекомбинантных методик с помощью синтетического линкера, который позволяет им приобрести форму одиночной белковой цепи, в которой участки VL и VH спариваются для образования моновалентных молекул (известны как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; и Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включаются в сферу охвата термина «фрагмент антитела». Эти фрагменты антител получают с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, при этом пригодность фрагментов проверяют таким же способом, каким проверяют интактные антитела. Фрагменты антител также могут быть включены в однодоменные антитела, макроантитела, миниантитела, интраантитела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и биспецифические scFv (см., например, Hollinger and Hudson, (2005) *Nature Biotechnology* 23:1126-1136). Фрагменты антител могут быть привиты на каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин тип III (Fn3) (см. патент США № 6 703 199, в котором описаны моноклеточные полипептиды фибронектина). Фрагменты антител могут быть включены в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных сегментов Fv (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными легкими полипептидными цепями образуют пару антигенсвязывающих участков (Zapata et al., (1995) *Protein Eng.* 8:1057-1062; и патент США № 5 641 870).

Термин «**введенный**» или «**введение**» включает в себя, помимо прочего, доставку лекарственного средства инъекционным способом, таким как, например, внутривенный, внутримышечный, внутрикожный или подкожный путь, или через слизистую оболочку, например, в виде назального спрея или аэрозоля для ингаляции, или в виде раствора для приема внутрь, капсулы или таблетки. Предпочтительно введение представляет собой инъекционную форму.

Термин «**эффektorная функция**» относится к тем видам биологической

активности, которые свойственны Fc-области антитела и варьируются в зависимости от изотипа антитела. Неограничивающие примеры эффекторных функций антитела включают в себя связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP); снижение экспрессии поверхностных рецепторов клетки (например, рецептора В-клетки); и активацию В-клеток.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или **«ADCC»** обозначает форму цитотоксичности, при которой антитела связываются с Fc-рецепторами (FcRs), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, NK-клетки, нейтрофилы и макрофаги), позволяя цитотоксическим эффекторным клеткам специфично связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген, и в последующем уничтожать клетку-мишень с помощью цитотоксинов. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

«Комплементзависимая цитотоксичность» или **CDC** обозначает лизис клетки-мишени в присутствии комплемента. Классический путь активации комплемента начинается со связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса) по настоящему изобретению, которые связаны с распознанным ими антигеном.

«Антителозависимый клеточный фагоцитоз» или **ADCP** обозначает механизм элиминации нагруженных антителами клеток-мишеней путем интернализации клетками-фагоцитами, такими как макрофаги или дендритные клетки.

Термин **«гемобластоз»** включает в себя опухоли и заболевания или нарушения системы крови, связанные с патологическим клеточным ростом и/или пролиферацией в тканях гематопоэтического происхождения, такие как лимфомы, лейкозы и миеломы.

Неходжкинская лимфома (**NHL**) представляет собой гетерогенное злокачественное новообразование, возникающее из лимфоцитов. В Соединенных Штатах (США) заболеваемость исчисляется 65 000 случаев/год, со смертностью приблизительно 20 000 (Американское онкологическое общество (American Cancer Society, 2006; и SEER Cancer Statistics Review)). Заболевание может развиваться в любом возрасте, с дебютом обычно у взрослых старше 40 лет и с увеличивающейся с возрастом частотой. NHL характеризуется клональной пролиферацией лимфоцитов, которые накапливаются в лимфатических узлах, крови, костном мозге и селезенке, хотя может быть поражен любой крупный орган. Текущая система классификации, используемая патологоанатомами и клиницистами, - это Классификация опухолей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), которая разделяет NHL на предраковые и зрелые В-клеточные или Т-клеточные новообразования. В настоящее время PDQ делит NHL на вялотекущую и агрессивную для включения в клинические испытания. Группа медленно растущих NHL состоит, в основном, из фолликулярных подтипов, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, MALT-лимфомы

(лимфоидная ткань слизистых оболочек) и лимфомы маргинальной зоны, и включает в себя приблизительно 50% пациентов с впервые диагностированной В-клеточной NHL. Агрессивная форма NHL включает в себя пациентов с гистологическим диагнозом первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBL, «DLBCL» или DLCL) (40% пациентов с впервые диагностированной NHL имеют диффузную крупноклеточную форму), лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы («MCL»). Клиническое течение NHL крайне вариабельно. Основной детерминантой клинического течения является гистологический подтип. Большинство медленно растущих вариантов NHL считаются неизлечимыми заболеваниями. Сначала пациенты отвечают на химиотерапию или терапию антителами, но у большинства возникает рецидив. До настоящего времени в исследованиях не доказано увеличение выживаемости при раннем вмешательстве. В отношении бессимптомных пациентов допустимым является тактика «наблюдения и выжидания» до тех пор, пока у пациента не появятся симптомы или развитие заболевания не ускорится. Со временем заболевание может трансформироваться в более агрессивный гистологический подтип. Медиана выживаемости составляет от 8 до 10 лет, и пациенты с медленно растущей опухолью часто получают 3 или более курсов лечения в ходе фазы лечения их заболевания. Традиционно начальная стадия лечения симптомного пациента с медленно растущей NHL представляла собой комбинированную химиотерапию. Наиболее часто применяемые агенты включают: циклофосфамид, винкристин и преднизон (СVP), или циклофосфамид, адриамицин, винкристин, преднизон (СНОР). Приблизительно от 70% до 80% пациентов отвечают на стартовую химиотерапию, при этом длительность ремиссий составляет около 2-3 лет. В конечном счете, у большинства пациентов наступает рецидив. Разработка и клиническое применение антитела к CD20, ритуксимаба, значительно повысили частоту ответа и показатель выживаемости. Современный стандарт лечения для большинства пациентов представляет собой ритуксимаб+СНОР (R-СНОР) или ритуксимаб+СVP (R-СVP). Как было доказано, терапия ритуксимабом является эффективной в отношении нескольких вариантов NHL, и в настоящее время утверждена в качестве терапии первой линии как при медленно растущей (фолликулярная лимфома), так и при агрессивной NHL (диффузная В-крупноклеточная лимфома). Однако, имеются существенные ограничения для применения антитела к CD20 (mAb), включающие первичную резистентность (50% ответ у пациентов с рецидивами медленно растущей опухоли), приобретенную резистентность (50% частота ответа после возобновления лечения), редкий полный ответ (2% частота полного ответа в совокупности пациентов с рецидивами) и продолжительный характер рецидива. И, наконец, многие В-клетки не экспрессируют CD20, а значит многие нарушения В-клеточного звена не поддаются лечению с помощью терапии антителами к CD20.

Помимо NHL, существует несколько типов лейкоза, которые являются следствием нарушения регуляции В-клеток. Хронический лимфоцитарный лейкоз (также известный как «хронический лимфолейкоз» или «CLL») представляет собой вид лейкоза взрослых, вызванного патологическим скоплением В-лимфоцитов. При ХЛЛ злокачественные

лимфоциты могут выглядеть нормальными и зрелыми, но они не способны эффективно справляться с инфекцией. CLL является наиболее частой формой лейкоза у взрослых. Среди мужчин CLL развивается в два раза чаще, чем среди женщин. Несмотря на это, основным фактором риска является возраст. Свыше 75% новых случаев диагностируют среди пациентов старше 50 лет. Ежегодно диагностируют более 10 000 случаев, а смертность составляет почти 5 000 случаев в год (American Cancer Society, 2006; и SEER Cancer Statistics Review). CLL является неизлечимым заболеванием, но в большинстве случаев прогрессирует медленно. Многие люди с CLL ведут нормальный и активный образ жизни на протяжении многих лет. Из-за медленного начала заболевания CLL на ранней стадии обычно не лечат, так как предполагается, что вмешательство на ранней стадии CLL не увеличивает время выживаемости или не повышает качество жизни. Вместо этого наблюдают за состоянием в динамике. Стартовая терапия CLL варьируется в зависимости от точного диагноза и прогрессирования заболевания. Имеются множество агентов, применяемых для терапии CLL. Схемы комбинированной химиотерапии, такие как FCR (флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб) и BR (ибрутиниб и ритуксимаб), эффективны как при впервые диагностированной, так и при рецидивирующей форме CLL. Из-за существующего риска аллогенная трансплантация костного мозга (стволовых клеток) редко применяется в качестве терапии первой линии CLL.

Другим видом лейкоза является мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома («SLL»), которая считается вариантом CLL без клонального лимфоцитоза, необходимого для диагноза CLL, но при этом имеет те же патологические и иммунофенотипические свойства (Campo et al., 2011). Согласно определению, при SLL должны присутствовать лимфаденопатия и/или спленомегалия. Кроме того, число В-лимфоцитов в периферической крови не должно превышать $5 \times 10^9/\text{л}$. Диагноз SLL, по возможности, следует подтверждать с помощью патогистологического исследования биопсии лимфатического узла (Halleket et al., 2008). В США доля случаев с SLL составляет приблизительно 25% от всех случаев CLL (Dores et al., 2007).

Другим типом лейкоза является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), также известный как острый лимфоцитарный лейкоз. ALL характеризуется гиперпродукцией и непрерывным размножением злокачественных и незрелых лейкоцитов (также известных как лимфобласты) в костном мозге. Термин «острый» указывает на недифференцированное, незрелое состояние циркулирующих лимфоцитов («бластные клетки»), а также на быстрое прогрессирование заболевания с продолжительностью жизни от недель до месяцев, если заболевание не лечат. ALL чаще всего встречается в детском возрасте с пиком частоты в 4-5 лет. Дети 12-16 лет умирают от него чаще, чем дети других возрастов. В настоящее время по меньшей мере 80% случаев ALL в детском возрасте считаются излечимыми. Ежегодно диагностируют до 4 000 случаев, а смертность составляет почти 1 500 случаев в год (American Cancer Society, 2006; и SEER Cancer Statistics Review).

«Субъект» или «пациент» в данном контексте обозначает любое млекопитающее,

включая грызунов, таких как мышь или крыса, а также приматов, таких как яванский макак (*Macaca fascicularis*), макака-резус (*Macaca mulatta*) или человек (*Homo sapiens*). Предпочтительно субъект или пациент представляет собой примата, наиболее предпочтительно пациента-человека, еще более предпочтительно взрослого пациента-человека.

Термины «**сконструированный**» или «**модифицированный**» в контексте настоящего документа включают в себя манипуляцию с нуклеиновыми кислотами или полипептидами с помощью средств для синтеза (например, с помощью рекомбинантных технологий, синтеза пептидов *in vitro*, ферментативного или химического образования пептидной связи, или комбинации этих методик). Предпочтительно антитела или фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением сконструированы или модифицированы для улучшения одного или более свойств, таких как связывание антигена, стабильность, период полужизни, эффекторная функция, иммуногенность, безопасность и т. п. Предпочтительно антитела и фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением сконструированы или модифицированы для улучшения эффекторной функции, такой как ADCC.

Термин «**Fc-область**» применяется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, CH2-домен и CH3-домен. Если настоящим документом не установлено иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-участке проводится в соответствии с системой нумерации EU, также называемой EU-индекс, как описано в работе Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Антитело, вводимое в соответствии с настоящим изобретением, вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. «**Терапевтически эффективное количество**» обозначает количество, достаточное для обеспечения улучшения клинических проявлений конкретного заболевания или расстройства. Количество, эффективное для конкретной терапевтической цели, будет зависеть от тяжести заболевания или поражения, а также от массы и общего состояния субъекта. Следует понимать, что соответствующую дозу можно установить с помощью постановки стандартного эксперимента, при котором создают матрицу значений и испытывают различные значения в матрице, все этапы из которых находятся в пределах обычных навыков обученного врача или клинического исследователя.

Термины «комбинация» или «**фармацевтическая комбинация**» относятся к введению одной терапии в дополнение к другой терапии. Как таковое, фраза «**в комбинации с**» включает одновременное (например, сопутствующее) и последовательное применение в любом порядке. В виде неограничивающего примера, первую терапию (например, агент, такой как антитело к CD19) можно вводить пациенту до начала (например, за 1 минуту, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели,

3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 1 минуту, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель, или более продолжительное время) применения второй терапии (например, фармацевтический агент, такой как **Т-клетки $\gamma\delta$**).

В контексте данного документа термин « **$\gamma\delta$ Т-клетки (гамма-дельта Т-клетки)**» относится к подмножеству Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный Т-клеточный рецептор (TCR), а именно $\gamma\delta$ TCR, состоящий из одной γ -цепи и одной δ -цепи. Термин « **$\gamma\delta$ Т-клетки**» конкретно включает все подмножества $\gamma\delta$ Т-клеток, включая, без ограничения, $\nu\delta 1$, $\nu\delta 2$, $\nu\delta 3$ и $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетки, а также наивные, эффекторные клетки памяти, центральные клетки памяти и терминально дифференцированные $\gamma\delta$ Т-клетки. В качестве дополнительного примера термин « **$\gamma\delta$ Т-клетки**» включает $\nu\delta 4$, $\nu\delta 5$, $\nu\delta 7$ и $\nu\delta 8$ Т-клетки.

Термин «**Т-лимфоцит**» или «**Т-клетка**» в контексте данного документа относится к иммунной клетке, экспрессирующей CD3 (CD3+) и Т-клеточный рецептор (TCR+). Т-клетки играют центральную роль в клеточном иммунитете.

Термин «**TCR**» или «**Т-клеточный рецептор**» в контексте данного документа относится к димерному гетерологичному сигнальному белку клеточной поверхности, образующему альфа-бета или гамма-дельта рецептор. $\alpha\beta$ TCR распознают антиген, представленный молекулой МНС, тогда как $\gamma\delta$ TCR может распознавать антиген независимо от представления МНС.

Термин «**клеточная популяция**» в контексте данного документа относится к ряду клеток. Клеточная популяция может быть, например, смешанной популяцией клеток, полученной из образца периферической крови, образца пуповинной крови, опухоли, предшественника стволовых клеток, биоптата опухоли, ткани, лимфы или эпителиальных тканей субъекта, непосредственно контактирующих с внешней средой или происходящих из стволовых клеток-предшественников. В альтернативном варианте смешанная клеточная популяция может быть получена из культур клеток млекопитающих *in vitro*, полученных из образца периферической крови, образца пуповинной крови, опухоли, предшественника стволовых клеток, биоптата опухоли, ткани, лимфы или эпителиальных тканей субъекта, непосредственно контактирующих с внешней средой или происходящих из стволовых клеток-предшественников.

«**Обогащенная**» клеточная популяция или препарат относится к клеточной популяции, полученной из исходной смешанной клеточной популяции, и содержащей больший процент клеток определенного типа, чем процент клеток этого типа в исходной популяции. Например, исходная смешанная клеточная популяция может быть обогащена для получения специфической популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. Во всех вариантах осуществления обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток содержит меньший процент популяций $\alpha\beta$ Т-клеток.

Под термином «**размноженный**» в данном документе подразумевается, что количество желаемого или целевого типа клеток (например, Т-клеток $\delta 1$, $\delta 2$ и/или $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток) в обогащенном препарате выше, чем количество в начальной или исходной популяции клеток.

Подробное описание изобретения

Однодоменные антитела к CD19

Применение антитела к CD19 при неспецифических В-клеточных лимфомах описано в публикациях WO2007076950 (US2007154473), при этом обе они включены в данный документ посредством ссылки. Применение антитела к CD19 при CLL, NHL и ALL описано в публикации Scheuermann et al. (CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995)), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Дополнительные антитела, специфичные к CD19, описаны в WO2005012493 (US7109304), WO2010053716 (US12/266,999) (Immunomedics); WO2007002223 (US US8097703) (Medarex); WO2008022152 (12/377,251) и WO2008150494 (Xencor), WO2008031056 (US11/852,106) (Medimmune); WO 2007076950 (US 11/648,505) (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (US12/253,895) (Seattle Genetics); и WO2010095031 (12/710,442) (Glenmark Pharmaceuticals), WO2012010562 и WO2012010561 (International Drug Development), WO2011147834 (Roche Glycart), и WO 2012156455 (Sanofi), все из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Фармацевтическая композиция включает в себя действующее вещество, например, антитело для терапевтического применения у человека. Фармацевтическая композиция может дополнительно включать в себя фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества.

Доза антитела или фрагмента антитела, содержащегося в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера тела пациента, симптомов, состояний, пути введения и т.п. Доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела, возраста или на индивидуума. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и продолжительность лечения. Эффективные дозы и схемы введения фармацевтических композиций, содержащих антитела или фрагменты антител, специфичных в отношении CD19, можно определить эмпирически; например, прогресс состояния пациента можно контролировать путем периодической оценки и соответствующим образом корректировать дозу. Более того, межвидовое приведение доз можно проводить с помощью хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Фармацевтическая композиция может включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены с помощью известных способов. Например, инъекционные препараты можно приготовить, например, путем растворения,

супспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, как правило, применяемой для инъекций. Типовые фармацевтические композиции, содержащие антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, описаны, например, в WO2008/022152 или WO2018/002031.

При определенных способах введения, т.е. внутривенное введение, предпочтительно вводить препарат с учетом массы тела пациента. При других способах введения, т.е. подкожное введение, предпочтительно вводить препарат в плоских фиксированных местах. Специалисту известно, какая доза при одном способе введения эквивалентна другой дозе при другом способе введения. Фармакодинамика конкретного лекарственного препарата обычно принимается во внимание при принятии обоснованного решения о введении лекарственного препарата в необходимом количестве и в требуемой эффективной дозе.

Антитело, вводимое в соответствии с настоящим изобретением, вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для излечения, облегчения или частичной остановки клинических проявлений данного заболевания или нарушения, то есть NHL, и его осложнений. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению вводят в дозе 9 мг/кг. В альтернативных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению вводят в дозе 12 мг/кг. В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению вводят в дозе 15 мг/кг или более.

Антитело по настоящему изобретению можно вводить в разные моменты времени, и курс лечения может иметь разную продолжительность. Антитела можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, еженедельно или раз в две недели. Антитела также можно вводить в течение по меньшей мере четырех недель, по меньшей мере в течение пяти недель, по меньшей мере в течение шести недель, по меньшей мере в течение семи недель, по меньшей мере в течение восьми недель, по меньшей мере в течение девяти недель, по меньшей мере в течение десяти недель, по меньшей мере в течение одиннадцати недель или по меньшей мере в течение двенадцати недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело вводят по меньшей мере один раз в неделю в течение по меньшей мере восьми недель.

Выделение и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток из крови

В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки по настоящему изобретению получают из крови (например, периферической крови) субъекта. Например, $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из клеток крови V δ 2 или клеток крови V δ 1. В другом примере $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из V γ 9V δ 2 Т-клеток крови. V γ 9V δ 2 Т-клетки можно выделять из периферической крови и в дальнейшем культивировать *ex vivo*. Культивирование V γ 9V δ 2 Т-клеток можно оптимизировать при наличии IL-2 и золедроновой кислоты (ZOL). Способы выделения и размножения V γ 9V δ 2 Т-клеток из крови включают способы, описанные, например, в публикации Hoeres et al. 2018, или

следующую процедуру:

Размножение *ex vivo* V γ 9V δ 2 Т-клеток, полученных из периферической крови:

Периферическую кровь собирали у доноров. РВМС немедленно выделяли центрифугированием в градиенте плотности с применением Lymphoprep™ (Axis Shield, Норвегия) в соответствии с инструкциями производителя. РВМС ресуспендировали до 1×10^6 /мл в CTS™ OpTmizer™ для размножения Т-клеток SFM (Life Technologies, Австралия), с добавлением OpTmizer™ для размножения Т-клеток (разведение 1:38) (Life Technologies, Австралия), 10% термоинактивированной FBS (HI-FBS), 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицин, 2 ммоль L-глутамин (Life Technologies, Австралия), 25 мМ HEPES, 0,1% β -меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 100 МЕ/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина 2 (rhIL-2) (BD Pharmingen, США), активировали с применением 5 мкМ ZOL и высевали в 6-луночные планшеты. Плотность клеточной культуры следует поддерживать на уровне $1-2 \times 10^6$ клеток/мл и пополнять свежей средой, содержащей только 100 МЕ/мл rhIL-2 (без ZOL) каждые 2-3 дня. Через 7-8 дней культивирования клетки собирали и обогащали, как описано ниже.

Обогащение V γ 9V δ 2 Т-клеток:

Размноженные *ex vivo* Т-клетки V γ 9V δ 2 обогащали с помощью MACS для отрицательной селекции с набором для выделения TCR γ/δ + Т-клеток (человека) (Miltenyi Biotec, Германия). Жизнеспособность клеток и общее количество клеток после обогащения оценивали с помощью исключения с трипановым синим. Процент V γ 9V δ 2 Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с применением конъюгированного с РeCy5 антитела анти-CD3 (клон UCНТ1) (eBioscience, Сан-Диего, штат Калифорния, США) и конъюгированного с FITC антитела анти-V γ 9 TCR от BD Biosciences (Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Процентное содержание V γ 9V δ 2 Т-клеток идентифицировали путем гейтирования популяции лимфоцитов с помощью прямого рассеяния/бокового рассеяния, а затем двойных положительных клеток V γ 9+ CD3+.

В некоторых вариантах осуществления моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) могут быть получены от субъекта любым подходящим способом, известным в данной области. РВМС можно культивировать в присутствии аминокислот (например, золедроновой кислоты), синтетических фосфоантигенов (например, бромгидринпирофосфата; BrHPP), 2МЗВ1РР или 2-метил-3-бутенил-1-пирофосфата в присутствии ИЛ-2 в течение одной-двух недель для создания обогащенной популяции клеток V δ 2. В альтернативном варианте иммобилизованные антитела анти-TCR $\gamma\delta$ (например, рап TCR $\gamma\delta$) могут индуцировать преимущественное размножение клеток V δ 2 из популяции РВМС в присутствии ИЛ-2, например, в течение примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное размножение клеток V δ 2 из РВМС может быть достигнуто при культивировании иммобилизованных антител к CD3 (например, ОКТ3) в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-4. В некоторых вариантах осуществления указанную выше культуру поддерживают в течение около семи дней до пересева в растворимые анти-CD3, ИЛ-2 и ИЛ-4. В альтернативном варианте искусственные

антигенпрезентирующие клетки можно применять для стимуляции предпочтительного размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как клетки V δ 2. Например, полученные из РВМС $\gamma\delta$ Т-клетки, культивируемые в присутствии облученных аАРС, IL-2 и/или IL-21, могут размножаться с образованием популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, включая высокую долю клеток V δ 2, умеренную долю клеток V δ 1 и несколько двойных отрицательных клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов РВМС могут быть предварительно обогащены или постобогащены (например, посредством положительной селекции с применением TCR $\gamma\delta$ -специфических агентов или отрицательной селекции с применением TCR α -специфических агентов). Такие способы и другие подходящие способы размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как клетки V δ 2, подробно описаны в публикации Deniger et al. , *Frontiers in Immunology* 2014, 5, 636: 1-10, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Более того, Almeida et al. (*Clinical Cancer Research* 2016, 22, 23; 5795-5805), полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки, обеспечивает подходящие способы получения популяции Т-клеток V δ 1, которые можно сконструировать для экспрессии гетерологичной нацеливающей конструкции, описанной в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления РВМС предварительно обогащают с помощью сортировки с помощью магнитных гранул, что может обеспечить более 90% $\gamma\delta$ Т-клеток.

Отделение и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток, присущим негемопозитическим тканям, от негемопозитических тканей

$\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопозитическим тканям, полученные, как описано в данном документе, проявляют хорошую способность проникать в опухоль и удерживаться в ней. Более подробные способы выделения и размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитическим тканям, можно найти, например, в заявке Великобритании № 1707048.3 (WO2018/202808) и в международной патентной публикации № WO 2017/072367 (US Publ. № 2018/0312808), которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Присущие негемопозитическим тканям $\gamma\delta$ Т-клетки (например, происходящие из кожи $\gamma\delta$ Т-клетки и/или не-V δ 2 Т-клетки, например, V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки) могут быть выделены из любой негемопозитической ткани человека или животного, отличного от человека, которые могут быть взяты у пациента для получения клеток, подходящих для конструирования в соответствии со способами настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления негемопозитическая ткань, из которой происходят и размножаются $\gamma\delta$ Т-клетки, представляет собой кожу (например, кожу человека), которую можно получить с помощью способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления кожу получают путем пункционной биопсии. В альтернативном варианте, способы выделения и размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, представленные в данном документе, могут быть применены к желудочно-кишечному тракту (например, толстой кишке), молочной железе, легкому, предстательной железе печени, селезенке и поджелудочной железе. $\gamma\delta$ Т-клетки могут также находиться в раковых тканях человека,

например, в опухолях молочной железы или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки могут происходить из раковых тканей человека (например, из тканей солидной опухоли). В других вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки могут происходить из негемопоетической ткани, отличной от раковой ткани человека (например, ткани без значительного количества опухолевых клеток). Например, $\gamma\delta$ Т-клетки могут происходить из участка кожи (например, здоровой кожи), отделенного от близлежащей или соседней раковой ткани.

$\gamma\delta$ Т-клетки, которые преобладают в крови, представляют собой в основном V δ 2 Т-клетки, в то время как $\gamma\delta$ Т-клетки, которые доминируют в негемопоетических тканях, представляют собой в основном V δ 1 Т-клетки, так что V δ 1 Т-клетки включают около 70-80% популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, не присущих гемопоетическим тканям. Однако некоторые V δ 2 Т-клетки также обнаруживаются в негемопоетических тканях, например, в кишечнике, где они могут включать около 10-20% $\gamma\delta$ Т-клеток. Некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопоетическим тканям, не экспрессируют ни V δ 1, ни V δ 2 TCR, и авторы назвали их двойными отрицательными (DN) $\gamma\delta$ Т-клетками. Эти DN $\gamma\delta$ Т-клетки, вероятно, в основном экспрессируют V δ 3 с меньшинством Т-клеток, экспрессирующих V δ 5. Таким образом, $\gamma\delta$ Т-клетки, которые обычно присущи негемопоетическим тканям и которые размножаются с помощью способа по данному изобретению, предпочтительно не являются V δ 2 Т-клетками, т.е. Т-клетки V δ 1 с включением меньшего количества DN $\gamma\delta$ Т-клеток.

В целом, $\gamma\delta$ Т-клетки, присущи негемопоетическим тканям, способны спонтанно размножаться при удалении физического контакта со стромальными клетками (например, фибробластами кожи). Таким образом, способы культивирования на основе каркаса, описанные выше, могут применяться для индуцирования такого разделения, что приводит к депрессии $\gamma\delta$ Т-клеток для запуска размножения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления на этапе размножения не происходит существенной активации пути TCR (например, в культуру не включаются экзогенные активаторы пути TCR). Кроме того, в настоящем изобретении предлагаются способы размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопоетическим тканям, при этом указанные способы не включают контакт с фидерными клетками, опухолевыми клетками и/или антигенпрезентирующими клетками.

Способы лечения

Фармацевтические композиции, содержащие несконструированную, обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированную, обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси, как описано в данном документе, можно вводить с целью профилактического и/или терапевтического лечения. В терапевтических целях, композиции можно вводить субъекту, уже страдающему от заболевания или патологического состояния, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного купирования симптомов заболевания или патологического состояния. Несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их

смеси также можно вводить для уменьшения вероятности развития, заболевания или ухудшения патологического состояния. Эффективные количества популяции несконструированных, обогащенных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированных, обогащенных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей для терапевтического применения могут варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания или патологического состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья субъекта, веса и/или ответа на лекарственные препараты и/или решения лечащего врача.

Несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта, нуждающегося в лечении патологического состояния.

Способ лечения патологического состояния у субъекта с обогащенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток и антителом или фрагментом антитела, специфичным в отношении CD19 по настоящему изобретению, может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей. Обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси согласно настоящему изобретению можно вводить по различным схемам (например, в зависимости от времени, концентрации, дозировки, интервалов между курсами лечения и/или состава). Субъект также может быть подвергнут предварительной подготовке, например, путем применения химиотерапии, облучения или их комбинации, до получения обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей согласно настоящему изобретению. В рамках лечения субъекту по первой схеме можно вводить несконструированную, обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированную, обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси, и за субъектом можно установить мониторинг, чтобы определить, соответствует ли лечение по первой схеме заданному уровню терапевтической эффективности.

Обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, т. е. несконструированных или сконструированных, и/или их смеси согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных патологических состояний. В некоторых случаях неинженерная обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения рака, включая солидные опухоли и гемобластоз.

Способы введения

Одну или множество несконструированных, обогащенных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированных, обогащенных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси, по настоящему изобретению можно вводить субъекту в любом порядке или одновременно. В случае одновременного введения, множественная несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть предоставлены в единой унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в виде множества форм, например, в виде

множества внутривенных инфузий, п/к, инъекций или таблеток. Несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть упакованы вместе или по отдельности, в единую упаковку или во множество упаковок. Одна или все из следующих популяций: несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть введены в нескольких дозах. В случае одновременного введения, время между несколькими дозами может варьироваться до недели, месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или около года. В некоторых случаях неинженерная обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси по изобретению могут размножаться в организме субъекта *in vivo* после введения субъекту. Несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси могут быть заморожены, чтобы обеспечить клетки для множества обработок одним и тем же клеточным препаратом. Несконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению и фармацевтические композиции, содержащие их, могут быть упакованы в виде набора. Набор может включать инструкции (например, напечатанные инструкции) по применению несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей, и композиции, содержащей их.

В некоторых случаях способ лечения рака включает введение субъекту терапевтически эффективного количества несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей, при этом с помощью указанного введения лечат рак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей вводят в течение по меньшей мере около 10 секунд, 30 секунд, 1 минуты, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей вводят в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированной, обогащенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток и/или их смесей вводят в течение по меньшей мере двух недель.

Варианты осуществления

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки содержат обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления обогащенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток включает несконструированные или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки и/или их смеси. В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую комбинацию, содержащую антитело, специфичное в отношении CD19, и обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток для применения при лечении рака.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки содержат несконструированные или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки и/или их смеси. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию несконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток. В еще одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови, опухолевой ткани или негемопозитической ткани. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных из периферической крови.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом указанный рак представляет собой гематологический рак. В одном варианте осуществления указанный гемобластоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL) или острый лимфобластный лейкоз (ALL). В другом варианте осуществления указанный гемобластоз представляет собой неходжкинскую лимфому. В других вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы из лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается

фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят в дозе 9 мг/кг. В альтернативных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят в дозе 12 мг/кг. В других вариантах осуществления указанная доза составляет 15 мг/кг или более.

В вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, обладает цитотоксической активностью. В вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, содержит константную область, обладающую ADCC-индуцирующей активностью. В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, индуцирует ADCC.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом компоненты комбинации, антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят отдельно. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки вводят до введения антитела или фрагмента антитела, специфичного в отношении CD19. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят перед введением $\gamma\delta$ Т-клеток. В вариантах осуществления компоненты комбинации вводят в то время, когда оба компонента (препарата) действуют на пациента одновременно. Под «синергизмом» подразумевается, что оба препарата действуют на пациента одновременно. В вариантах осуществления компоненты комбинации вводят вместе, одновременно, по отдельности или последовательно, либо физически, либо во времени. В вариантах осуществления компоненты комбинации вводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки, для применения при лечении рака, при этом антитело анти-CD19 вводят еженедельно, раз в две недели или ежемесячно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки для применения при лечении рака, при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят в концентрации 12 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки для применения при лечении рака, при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят еженедельно, раз в две недели или ежемесячно после первого введения в День 1, а ингибитор BCL-2 вводят впервые в День 8. В другом варианте осуществления антитело

анти-CD19 или его фрагмент после первого введения в День 1 вводят еженедельно в течение первых 3 месяцев и раз в две недели в течение по меньшей мере следующих 3 месяцев.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело к CD19 или его фрагмент антитела для применения при лечении пациентов с гемобластозом, при этом указанный пациент с гематологическим раком страдает неходжкинской лимфомой и где указанное антитело к CD19 или его фрагмент антитела вводят в сочетание с $\gamma\delta$ Т-клетками.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело к CD19 или его фрагмент антитела для применения при лечении пациентов с гемобластозом, при этом указанный пациент с гематологическим раком страдает неходжкинской лимфомой и где указанное антитело к CD19 или его фрагмент антитела вводят в сочетание с $\gamma\delta$ Т-клетками. В одном варианте осуществления указанный пациент с гематологическим раком имеет неходжкинскую лимфому, выбранную из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы из лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы.

В варианте осуществления антитело к CD19 или его фрагмент для применения в лечении пациентов с гемобластозом содержит участок HCDR1, включающий в себя последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), участок HCDR2, включающий в себя последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), участок HCDR3, включающий в себя последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), участок LCDR1, включающий в себя последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), участок LCDR2, включающий в себя последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и участок LCDR3, включающий в себя последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В еще одном варианте осуществления антитело к CD19 или его фрагмент для применения при лечении пациентов с гемобластозом в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками содержит вариабельную тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLV KPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 7)

и вариабельную легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 8).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело анти-CD19 или его фрагмент представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело или фрагмент антитела. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело анти-CD19 или его фрагмент принадлежит к изотипу IgG. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела

представляет собой IgG1, IgG2 или химерное IgG1/IgG2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения изотип антитела к CD19 сконструирован для усиления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. В другом варианте осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи антитела к CD19 содержит аминокислоты 239D и 332E, при этом нумерация Fc соответствует EU-индексу, представленному по Kabat. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG1/IgG2, а константная область химерной тяжелой цепи антитела к CD19 содержит аминокислоты 239D и 332E, при этом нумерация Fc соответствует EU-индексу, представленному по Kabat.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 для применения при лечении пациентов с гематологическим раком в комбинации с Т-клетками $\gamma\delta$ содержит тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

и легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 для применения при лечении пациентов с гематологическим раком в комбинации с Т-клетками $\gamma\delta$ содержит переменную тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)

и переменную легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 8)

или переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны участку тяжелой переменной цепи с последовательностью

SEQ ID NO: 7 и вариабельному участку легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 для применения при лечении пациентов с гематологическим раком в комбинации с Т-клетками $\gamma\delta$ содержит вариабельную тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)

и вариабельную легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 8)

или вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны вариабельному участку тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и вариабельному участку легкой цепи SEQ ID NO: 8, при этом антитело к CD19 содержит область HCDR1, содержащую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2, содержащую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3, содержащую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1, содержащую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2, содержащую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и область LCDR3, содержащую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6). В другом варианте осуществления область тяжелой цепи антитела к CD19 содержит аминокислоты 239D и 332E, при этом нумерация Fc соответствует EU-индексу, представленному по Kabat.

В другом варианте осуществления антитело к CD19 или его фрагмент антитела для применения при лечении пациентов с гемобластозом в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

и легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

или тяжелую цепь и легкую цепь, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 7 и легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8.

В другом варианте осуществления антитело к CD19 или его фрагмент антитела для применения при лечении пациентов с гемобластозом в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность

EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

и легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

или тяжелую цепь и легкую цепь, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 7 и легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8, при этом антитело к CD19 содержит область HCDR1, содержащую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2, содержащую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3, содержащую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1, содержащую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2, содержащую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и область LCDR3, содержащую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6). В другом варианте осуществления область тяжелой цепи антитела к CD19 содержит аминокислоты 239D и 332E, при этом нумерация Fc соответствует EU-индексу, представленному по Kabat.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается антитело анти-CD19, при этом указанное антитело к CD19 вводят в концентрации 12 мг/кг.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю в течение первых 3 месяцев и один раз в две недели в течение по

меньшей мере следующих 3 месяцев. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю в течение первых 3 месяцев. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю в течение первых 3 месяцев и один раз в две недели в течение по меньшей мере следующих 3 месяцев. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю в течение первых 3 месяцев, один раз в две недели в течение следующих 3 месяцев и один раз в месяц в последующем. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD19 вводят один раз в неделю в течение первых 3 месяцев, один раз в две недели в течение следующих 3 месяцев и один раз в месяц в последующем.

В настоящем изобретении предлагается антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, для применения при лечении рака, при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови, опухолевой ткани или негемопэтической ткани. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных из периферической крови. В другом варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных из периферической крови и культивируемых в присутствии IL-2 и ZOL. В другом примере $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой популяцию происходящих из крови V γ 9V δ 2 Т-клеток.

В настоящем изобретении предлагается антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, для применения при лечении рака, при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного к CD19, вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками, при этом этап введения осуществляется путем введения антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клеток в комбинации одновременно, по порядку или в обратном порядке.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается применение фармацевтической комбинации, содержащей антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клеток, для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, включающий этап введения субъекту антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клеток в комбинации. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, включающий этап введения субъекту антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клеток в комбинации, при этом этап введения осуществляют путем введения антитела, специфичного в отношении CD19 и $\gamma\delta$ Т-клеток, в комбинации одновременно, по порядку или в обратном порядке.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая комбинация, содержащая антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и гамма-

дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), для применения при лечении рака, при этом $\gamma\delta$ Т-клетки вводят в терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лимфоцитов (например, $\gamma\delta$ Т-клеток), полученных любым из способов, описанных выше, можно вводить в терапевтически эффективном количестве субъекту (например, для лечения рака, такого как гемобластоз). В некоторых случаях терапевтически эффективное количество лимфоцитов (например, $\gamma\delta$ Т-клеток) составляет менее 10×10^{12} клеток на дозу (например, менее 9×10^{12} клеток на дозу, менее 8×10^{12} клеток на дозу, менее 7×10^{12} клеток на дозу, менее 6×10^{12} клеток на дозу, менее 5×10^{12} клеток на дозу, менее 4×10^{12} клеток на дозу, менее 3×10^{12} клеток на дозу, менее 2×10^{12} клеток на дозу, менее 1×10^{12} клеток на дозу, менее 9×10^{11} клеток на дозу, менее 8×10^{11} клеток на дозу, менее 7×10^{11} клеток на дозу, менее 6×10^{11} клеток на дозу, менее 5×10^{11} клеток на дозу, менее 4×10^{11} клеток на дозу, менее 3×10^{11} клеток на дозу, менее 2×10^{11} клеток на дозу, менее 1×10^{11} клеток на дозу, менее 9×10^{10} клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее 5×10^{10} клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее 1×10^{10} клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее 5×10^9 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее 1×10^9 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее 5×10^8 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее 1×10^8 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее 5×10^7 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее 1×10^7 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее 5×10^6 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее 1×10^6 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^5$ клеток на дозу, менее 5×10^5 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^5$ клеток на дозу или менее 1×10^5 клеток на дозу).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество $\gamma\delta$ Т-клеток (например, например, происходящих из кожи или крови $\gamma\delta$ Т-клеток) составляет менее 10×10^{12} клеток в течение курса лечения (например, менее 9×10^{12} клеток, менее 8×10^{12} клеток, менее 7×10^{12} клеток, менее 6×10^{12} клеток, менее 5×10^{12} клеток, менее 4×10^{12} клеток, менее 3×10^{12} клеток, менее 2×10^{12} клеток, менее 1×10^{12} клеток, менее 9×10^{11} клеток, менее 8×10^{11} клеток, менее 7×10^{11} клеток, менее 6×10^{11} клеток, менее 5×10^{11} клеток, менее 4×10^{11} клеток, менее 3×10^{11} клеток, менее 2×10^{11} клеток, менее 1×10^{11} клеток, менее 9×10^{10} клеток, менее $7,5 \times 10^{10}$ клеток, менее 5×10^{10} клеток, менее $2,5 \times 10^{10}$ клеток, менее 1×10^{10} клеток, менее $7,5 \times 10^9$ клеток, менее 5×10^9 клеток, менее $2,5 \times 10^9$ клеток, менее 1×10^9 клеток, менее $7,5 \times 10^8$ клеток, менее 5×10^8 клеток, менее $2,5 \times 10^8$ клеток, менее 1×10^8 клеток, менее $7,5 \times 10^7$ клеток, менее 5×10^7 клеток, менее $2,5 \times 10^7$ клеток, менее 1×10^7 клеток, менее $7,5 \times 10^6$ клеток, менее 5×10^6 клеток, менее $2,5 \times 10^6$ клеток, менее 1×10^6 клеток, менее $7,5 \times 10^5$ клеток, менее 5×10^5 клеток, менее $2,5 \times 10^5$ клеток или менее 1×10^5 в течение курса лечения).

В некоторых вариантах осуществления доза $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в данном документе, включает около 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в данном документе, включает по меньшей мере 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 ,

$3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в данном документе, включает до 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг.

Комбинации

В настоящем изобретении предлагается антитело к CD19 или его фрагмент в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками для применения при лечении гематологического рака, при этом указанное антитело к CD19 или его фрагмент и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят в комбинации с одним или большим количеством фармацевтических агентов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное антитело к CD19 или его фрагмент и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят в комбинации с фармацевтическим агентом. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное антитело к CD19 или его фрагмент и $\gamma\delta$ Т-клетки применяют в комбинации с одним или большим количеством дополнительных фармацевтических агентов или дополнительным фармацевтическим агентом. В одном аспекте указанный фармацевтический агент представляет собой дополнительный фармацевтический агент. В одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный фармацевтический агент представляет собой биологическое или химиотерапевтическое средство. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанный фармацевтический агент представляет собой терапевтическое антитело или фрагмент антитела, азотистый иприт, аналог пурина, аналог талидомида, ингибитор фосфоинозитид-3-киназы, ингибитор BCL-2 или ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК). В другом варианте осуществления указанный фармацевтический агент представляет собой ритуксимаб, R-СНОР, циклофосфамид, хлорамбуцил, урамустин, ифосфамид, мелфалан, бендамустин, меркаптопурин, азатиоприн, тиогуанин, флударабин, талидомид, леналидомид, помалидомид, идеалалисиб, дувелисиб, копанлисиб, ибрутиниб или венетоклакс.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается антитело к CD19 или его фрагмент и $\gamma\delta$ Т-клетки для применения при лечении гематологического рака, при этом указанное антитело к CD19 или его фрагмент и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят в комбинации с ритуксимабом, R-СНОР, циклофосфамидом, хлорамбуцилом, урамустином, ифосфамидом, мелфаланом, бендамустином, меркаптопурином, азатиоприном, тиогуанином, флударабином, талидомидом, леналидомидом, помалидомидом, идеалалисибом, дувелисибом, копанлисибом, ибрутинибом или венетоклаксом.

Последовательности антитела

Таблица 1:

	SEQ ID NO:	Аминокислоты
HCDR1	SEQ ID NO: 1	SYVMH
HCDR2	SEQ ID NO: 2	NPYNDG
HCDR3	SEQ ID NO: 3	GTYYYYGTRVFDY

LCDR1	SEQ ID NO: 4	RSSKSLQNVNGNTYLY
LCDR2	SEQ ID NO: 5	RMSNLNS
LCDR3	SEQ ID NO: 6	MQHLEYPIT
VH	SEQ ID NO: 7	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFSTSYV MHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKQ GRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARG TYYYGTRVFDYWGQGTLVTVSS
VL	SEQ ID NO: 8	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNG NTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRF SGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPIT FGAGTKLEIK
Константный домен тяжелой цепи	SEQ ID NO: 9	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константный домен легкой цепи	SEQ ID NO: 10	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Полная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 11	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFSTSYV MHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKQ GRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARG TYYYGTRVFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

		QFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полная легкая цепь	SEQ ID NO: 12	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNG NTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRF SGSGSGTEFTLTISSLPEPDAVYYCMQHLEYPIT FGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

Демонстрационные примеры

Пример 1. Характеризация экспрессии CD19 и CD20 на исследуемых клеточных линиях

Это исследование было проведено для оценки цитотоксической активности Fc-усиленного антитела к CD19 тафаситамаба (MOR00208), опосредованного $\gamma\delta$ Т-клетками от разных доноров на клеточных линиях лимфомы и лейкемии, а также первичного опухолевого материала, полученного от пациентов, из ХЛЛ (хроническая Лимфоцитарный лейкоз), MCL (мантийно-клеточная лимфома) и B-ALL (острый лимфобластный лейкоз). Кроме того, оценивали антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксическую активность тафаситамаба в присутствии $\gamma\delta$ Т-клеток.

Различные клеточные линии лимфомы и лейкоза а также полученные от пациентов с лимфомой и лейкозом первичные опухолевые клетки оценивали в анализе антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) с различными концентрациями тафаситамаба и отрицательного контрольного антитела IgG1. $\gamma\delta$ Т-клетки выделяли от семи различных доноров и применяли в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней (соотношения E:T 0,7:1, 2,2:1, 6,7:1 и 20:1).

Материал, способы и анализ данных

$\gamma\delta$ Т-клетки:

$\gamma\delta$ Т-клетки экспрессируют переменные цепи V γ и V δ как часть комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), который структурно и функционально отличается от главного комплекса гистосовместимости (MHC), связывающего TCR $\alpha\beta$ Т-клеток. Несмотря на неограниченное и высокое комбинаторное разнообразие, цепь V δ 2 предпочтительно сочетается с цепью V γ 9. V γ 9V δ 2 Т-клетки составляют примерно 5% Т-клеток периферической крови, представляя доминирующую субпопуляцию $\gamma\delta$ Т-клеток в этом компартменте. $\gamma\delta$ Т-клетки от 7 разных доноров выделяли, стимулировали и

применяли, как указано ниже:

Донор	Характеристики	Анализ
1	d10 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ pos/CD3+:36,5%, TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 57,0%, CD56+/CD3-: 0,5%	Титрование дозы с применением клеток Јеко
2	d10 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ pos/CD3+:84,8%, TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 11,7%, CD56+/CD3-: 1,2%	Титрование дозы клетками U2932
3	d9 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ pos/CD3+:46,0%, TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 47,0%, CD56+/CD3-: 1,75%	Титрование дозы с применением клеток Јеко
4	d9 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ поз/CD3+: 60,8%, TCR $\gamma\delta$ нег/CD3+:12,6%, CD56+/CD3-: 1,4%	Клеточные линии цитотоксичности
5	d9 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ поз/CD3+: 69,5%, TCR $\gamma\delta$ нег/CD3+:23,2%, CD56+/CD3-: 2,6%	Клеточные линии цитотоксичности
6	d9 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ поз/CD3+:84,8%TCR $\gamma\delta$ нег/CD3+: 11,7%, CD56+/CD3-: 1,2%	Клеточные линии цитотоксичности
7	d9 после стимуляции Золедронатом/IL2, TCR $\gamma\delta$ поз/CD3+:67,3%TCR $\gamma\delta$ нег/CD3+: 24,4%, CD56+/CD3-: 3,6%	Цитотоксичность клеток пациента

Как указано в таблице, популяция стимулированных клеток, использованная для описанных экспериментов, состояла из трех основных популяций. Присутствовала лишь очень небольшая часть эффекторных клеток CD56+/CD3-NK (<5%), в то время как клетки TCR $\gamma\delta$ нег/CD3+ в некоторых случаях представляли большую популяцию, но эти клетки не запускали лизис клеток-мишеней. Следовательно, главным образом $\gamma\delta$ Т-клетки были ответственны за опосредованное антителами уничтожение клеток.

Клеточные линии и образцы пациентов

Клеточные линии (получены из DSMZ): Mino (мантийноклеточная лимфома), Daudi (лимфома Беркитта), Јеко-1 (мантийно-клеточная лимфома), U2932 (DLBCL), REN (B-ALL)

Образцы пациентов (периферическая кровь): 2x CLL (хронический лимфолейкоз), 2x MCL (мантийно-клеточная лимфома), 1x B-ALL (острый лимфобластный лейкоз)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Титрование дозы с клеточными линиями лимфомы

Эксперименты по титрованию начальной дозы для получения валидированной схемы анализа были выполнены с применением MOR00208 при концентрациях от 0,001 до 10 мкг/мл в присутствии четырех соотношений Е:Т $\gamma\delta$ Т-клеток (0,7:1, 2,2:1, 6,7:1 и 20:1), и при этом наблюдалось дозозависимое увеличение процента лизированных клеток-мишеней Jeko и U2932. Как и ожидалось, уничтожающая активность протестированных антител повышалась при более высоких соотношениях Е:Т, и наиболее отчетливые эффекты наблюдались при самых высоких протестированных соотношениях Е:Т 6,7:1 и 20:1. Максимальная эффективность лизиса клеток была достигнута при концентрациях 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл MOR00208 в двух протестированных клеточных линиях. Лизис клеток продемонстрировал зависящие от $\gamma\delta$ Т-клеток вариации донора с максимальным лизисом от 34,0% до 49,3% для клеток Jeko и 22,5% для клеток U2392 соответственно. Концентрация 1 мкг/мл MOR00208 (Fc-усиленный) была выбрана в качестве оптимальной концентрации для дальнейшего всестороннего анализа Fc-зависимого эффекта опосредованного антителами уничтожения клеток с помощью $\gamma\delta$ Т-клеток в отношении клеточных линий лейкоза и лимфомы, а также опухолевых клеток, полученных от пациентов.

Анализ цитотоксичности с клеточными линиями лимфомы/лейкоза

Чтобы определить потенциал уничтожения опухолевых клеток $\gamma\delta$ Т-клетками в комбинации с антителами к CD19, тафаситамаб тестировали в концентрации 1 мкг/мл с применением клеток Mino, Daudi, Jeko, U2932 и REN в качестве клеток-мишеней (**Фигура 1** и **Фигура 2**). Как и ранее, были протестированы четыре различных соотношения Е:Т от 0,7:1 до 20:1. И для всех клеточных линий эффекты MOR00208 в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками превосходили контроль IgG1 (MOR00208 > контроль IgG1) в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками. Как наблюдалось во время экспериментов по титрованию дозы, уничтожающая активность тестируемого антитела увеличивалась, и наиболее отчетливые эффекты были обнаружены при самых высоких протестированных соотношениях Е:Т 6,7:1 и 20:1. В частности, в двух клеточных линиях с наименьшим неспецифическим уничтожением (Mino и Jeko) наблюдался самый высокий удельный вклад антитела в активность уничтожения клеток. В обеих клеточных линиях активность MOR00208 статистически значимо отличалась от контроля IgG1 (**Фигура 1**). В трех клеточных линиях с более высоким уровнем неспецифического уничтожения профиль активности был сходным (MOR00208 > контроль IgG1), но специфические эффекты были ограничены (**Фигура 2**).

Анализ цитотоксичности с первичными клетками пациента

Как и в случае с клеточными линиями, первичные опухолевые клетки от двух пациентов с CLL, двух MCL и одного пациента с B-ALL выделяли и инкубировали с различными соотношениями Е:Т $\gamma\delta$ Т-клеток (от 0,7:1 до 20:1) одного донора, а также антителами, нацеленными на CD19, в концентрации 1 мкг/мл (**Фигура 3** и **Фигура 4**). В соответствии с наблюдениями на клеточных линиях MOR00208 продемонстрировал отчетливый специфический вклад в уничтожающую активность $\gamma\delta$ Т-клеток. Этот вклад

увеличивался с повышением отношения Е:Т на всех первичных клетках и был наиболее выражен при самом высоком протестированном соотношении Е:Т 20:1. Первичные клетки пациента тестировали только в одном эксперименте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, $\gamma\delta$ Т-клетки оказались перспективной популяцией эффекторных клеток в терапии опухолей на основе антител, что было продемонстрировано для Fc-усиленного антитела MOR00208, нацеленного на CD19, в этом исследовании. MOR00208 продемонстрировал сильную противоопухолевую активность, опосредованную присутствием $\gamma\delta$ Т-клеток, в отношении нескольких клеточных линий лимфомы и лейкоза, а также первичных клеток CLL, MCL и B-ALL, полученных от пациентов, и обеспечивал разумную рациональную комбинацию MOR00208 и $\gamma\delta$ Т-клетки как многообещающий подход к терапии лимфомы и лейкоза.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CD19 или его фрагмент антитела для применения при лечении гемобластоза, где указанное антитело к CD19 или его фрагмент антитела вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками.

2. Антитело к CD19 или его фрагмент по п. 1 для применения по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело анти-CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками, и при этом указанные $\gamma\delta$ Т-клетки содержат обогащенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток.

3. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело анти-CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками, и при этом указанные $\gamma\delta$ Т-клетки включают несконструированные или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки и/или их смеси.

4. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело анти-CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками, и при этом указанные $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови, опухолевой ткани или негемопозитической ткани для применения при лечении рака.

5. Антитело к CD19 или его фрагмент антитела по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело к CD19 или его фрагмент антитела вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками. и при этом указанные $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из периферической крови и культивируют в присутствии IL-2 и ZOL (англ.: zoledronic acid - рус.: золедроновая кислота).

6. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками, и при этом указанные $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой происходящие из крови V γ 9V δ 2 Т-клетки.

7. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения при лечении гемобластоза, отличающееся тем, что гемобластоз представляет собой хронический лимфолейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), малую лимфоцитарную лимфому (SLL) или острый лимфобластный лейкоз (ALL), и при этом указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов.

8. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов, и при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят отдельно.

9. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное

антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов, и при этом указанное антитело или фрагмент антитела, специфичного в отношении CD19, и $\gamma\delta$ Т-клетки вводят одновременно.

10. Антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов, и при этом антитело к CD19 или фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1, содержащую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2, содержащую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), и область HCDR3, содержащую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3) и переменную область легкой цепи, содержащую область LCDR1, содержащую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2, содержащую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и область LCDR3, содержащую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

11. Антитело к CD19 или его фрагмент по п. 10 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов и при этом антитело к CD19 или фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 7)

и переменную область легкой цепи

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 8).

12. Антитело к CD19 по п. 11 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело к CD19 или его фрагмент вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов и при этом антитело к CD19 или фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTQVHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAAKEEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

13. Антитело к CD19 или его фрагмент антитела по п. 11 для применения по

любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело к CD19 или его фрагмент антитела вводят в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что и антитело к CD19 содержит легкую цепь

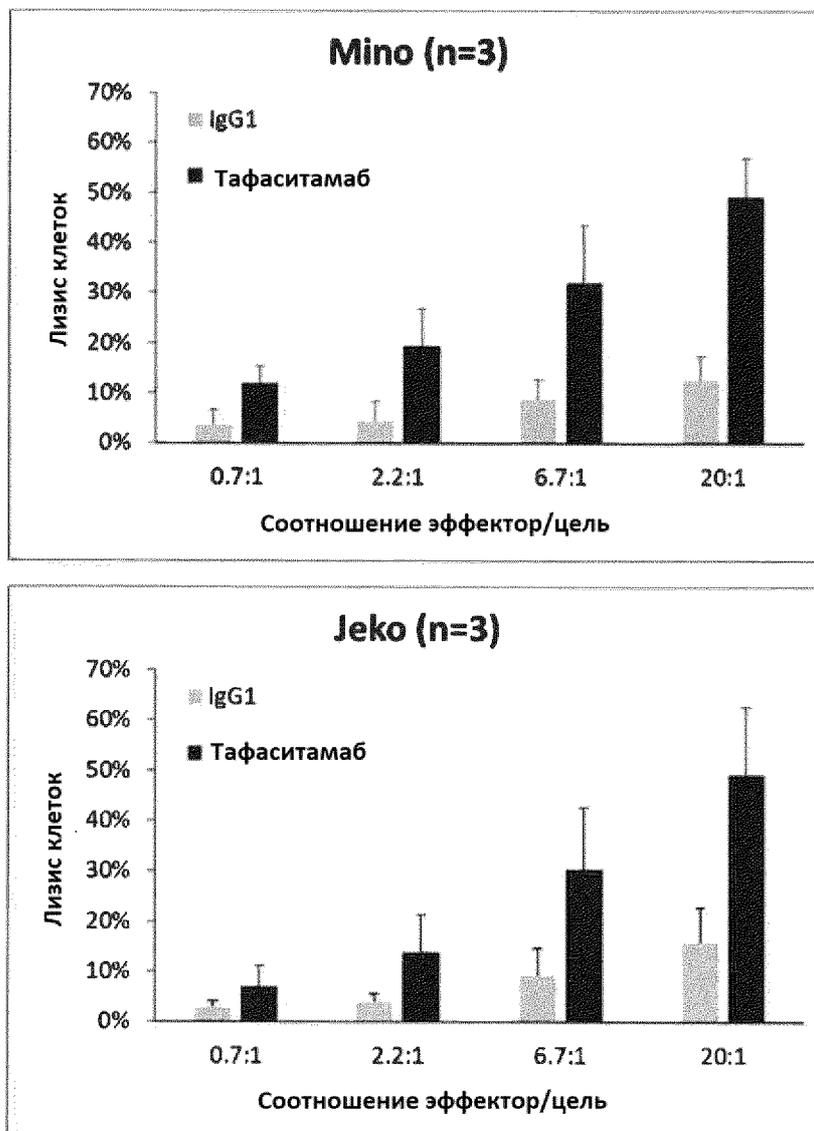
DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYIPITFGAGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).

14. Набор для лечения по любому из предшествующих пунктов, содержащий антитело к CD19 или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов и инструкции по введению указанного антитела анти-CD19 или его фрагмента в комбинации с $\gamma\delta$ Т-клетками по любому из предшествующих пунктов.

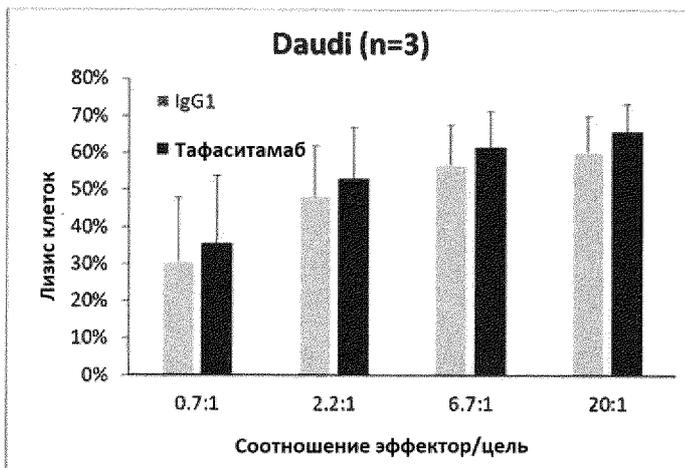
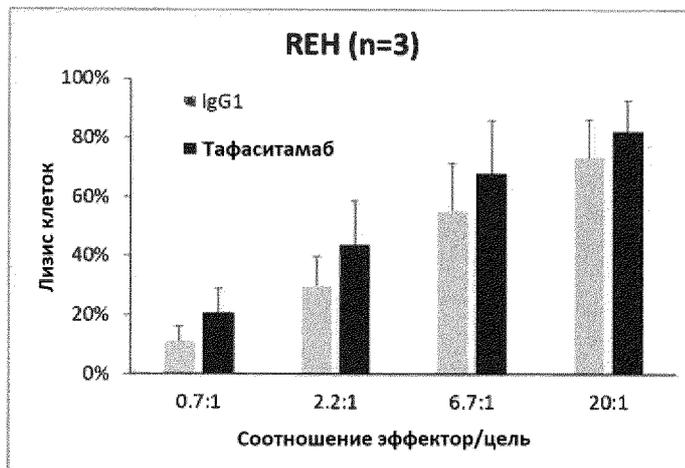
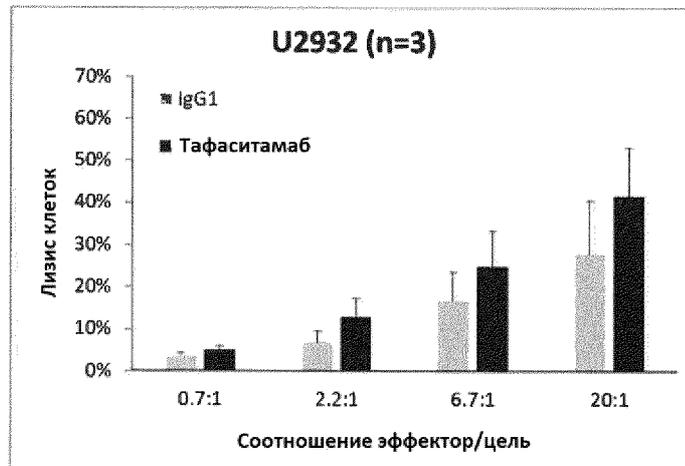
По доверенности

1/4

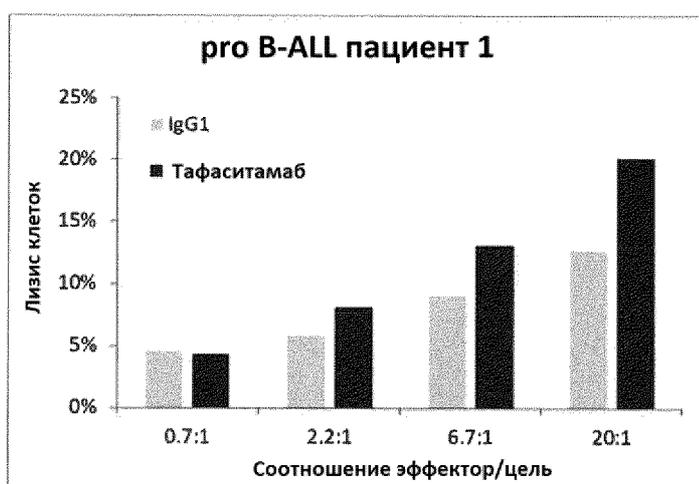
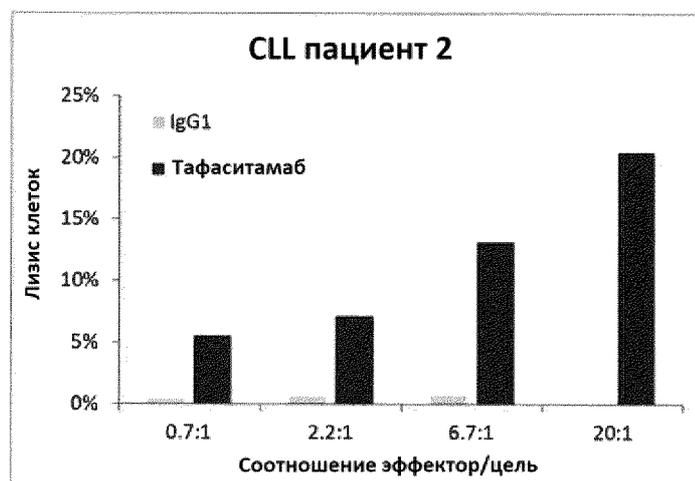
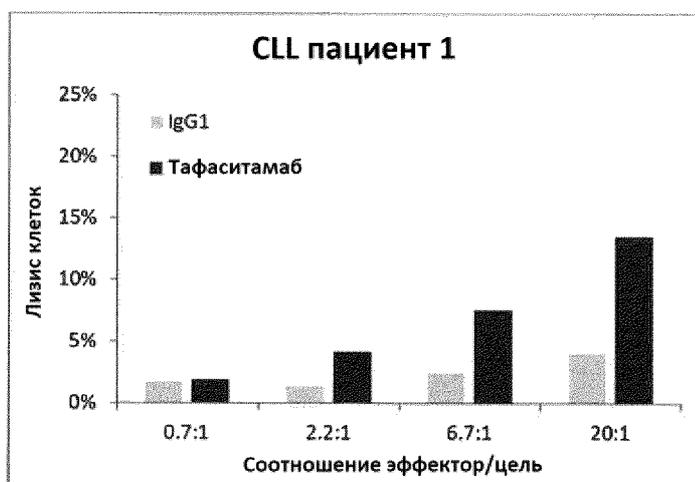
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

