

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293305 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

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

(22) Дата подачи заявки
2021.05.18

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ
ПЕРЕНАПРАВЛЕНИЯ Т-КЛЕТКИ И ИНГИБИТОР ПУТИ АДГЕЗИИ VLA-4

(31) 63/026,885

(32) 2020.05.19

(33) US

(86) PCT/IB2021/054258

(87) WO 2021/234560 2021.11.25

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Найр-Гупта Прианка, Годе Франсуа
(US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, и ее применение для уничтожения раковых клеток.

202293305

A1

A1

202293305

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ПЕРЕНАПРАВЛЕНИЯ Т-КЛЕТКИ И ИНГИБИТОР ПУТИ АДГЕЗИИ VLA-4

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 63/026,885, поданной 19 мая 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

10

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание относится к композициям и уничтожению раковых клеток с использованием терапевтических средств для перенаправления Т-клетки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия упомянутого перечня в формате ASCII, созданная 9 апреля 2021 г., называется JBI6312WOPCT1_SL.txt и имеет размер 29 килобайт.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Несмотря на наличие нескольких вариантов лечения, в настоящее время нет лекарства от острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и множественной миеломы (ММ). Даже после достижения высоких показателей (50–80%) полной гематологической ремиссии (ПР), определяемой как присутствие $\leq 5\%$ лейкобластов (ОМЛ) или плазмочитов (ММ) в костном мозге (КМ) (1, 2), у большинства пациентов обнаруживался рецидив АМЛ или ММ (3–5). Рецидив был связан с минимальной остаточной болезнью (МОБ), при этом небольшие количества раковых стволовых клеток (РСК) или других злокачественных клеток-предшественников не поддаются очистке и сохраняются даже после терапии (6). Предотвращение рецидивов и поиск лекарств от ОМЛ и ММ требуют поиска лучших стратегий для устранения МОБ.

25

30

Подобно гемопоэтическим стволовым клеткам (HSC), РСК при ОМЛ и ММ остаются и преимущественно персистируют в нише КМ (7, 8). Ниша КМ обеспечивает специализированное микроокружение за счет секреции растворимых факторов роста и межклеточных взаимодействий, которые защищают РСК (9). Более того, ниша КМ является иммуносупрессивной и считается сайтом иммунных привилегий в устойчивом состоянии для обеспечения нормального гемопоэза и образования иммунных клеток (10). Эти аспекты ниши КМ обеспечивали устойчивость к нескольким противораковым лекарственным средствам, включая химиотерапию, целевые низкомолекулярные ингибиторы и терапию на основе антител (11–14), и минимизировали их эффективность.

Способность Т-клеток специфически лизировать опухолевые клетки и секретировать цитокины для рекрутирования и поддержания иммунитета против рака делает их привлекательным вариантом для терапии. Несколько подходов основаны на этой стратегии, например, среди прочих, привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE, небольшие биспецифические биологические препараты), химерные антигенные рецепторы (CAR) и биспецифические антитела (15). BiTE и опосредованное антителами перенаправление обеспечивает поперечную сшивку Т-клеток с опухолевыми клетками посредством зацепления специфического эпитопа на опухолевых клетках и CD3 на Т-клетках, что приводит к активации Т-клеток и секреции перфоринов и гранзимов, которые в конечном итоге уничтожают опухолевые клетки. Эти способы терапии на основе перенаправления CD3 прошли валидацию в качестве эффективной противораковой стратегии в клинических условиях с одобрением CD19 x CD3 BiTE (блинатумомаб) для лечения острой лимфобластной лимфомы (ОЛЛ) (16). Однако иммуносупрессивный и защитный характер ниши КМ потенциально создает значимый барьер для терапии на основе перенаправления Т-клеток.

Например, как показано в настоящем документе, при использовании биспецифических антител, нацеленных на специфические опухолевые антигены (CD123 и BCMA) и CD3, было отмечено, что совместное культивирование клеточных линий ОМЛ или ММ со стромальными клетками КМ в значительной степени защищало раковые клетки от опосредованного биспецифическими Т-клетками лизиса *in vitro*. Аналогичные результаты наблюдались *in vivo*, когда присутствие стромальных клеток КМ человека в гуманизированной модели ксенотрансплантата ОМЛ ослабляло ингибирование роста опухоли (TGI), наблюдаемое при лечении биспецифическими

антителами. Пониженная цитотоксичность за счет перенаправления CD3 коррелировала со снижением ответов Т-эффекторных клеток, таким образом обеспечивая механизм, объясняющий потерю активности биспецифического антитела.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 В настоящем документе обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, причем терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки содержит первую область связывания, обладающую специфичностью к поверхностному антигену Т-клетки, и вторую область связывания, обладающую специфичностью к
10 опухолеассоциированному антигену (ТАА).

В одном варианте осуществления фармацевтической композиции композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой антитело
15 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции поверхностный антиген Т-клеток выбран из группы, состоящей из CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, CD40L, CD44, CD137, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 и NKG2C.

20 В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции поверхностный антиген Т-клеток представляет собой CD3.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции ТАА выбран из группы, состоящей из BCMA, CD123, GPRC5D, CD33, CD19, PSMA, TMEFF2, CD20, CD22, CD25, CD52, ROR1, HM1.24, CD38 и SLAMF7.

25 В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции поверхностный антиген Т-клеток представляет собой биспецифическое антитело BCMAxCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

30 В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции биспецифическое антитело BCMAxCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В еще одном варианте осуществления фармацевтической композиции поверхностный антиген Т-клеток представляет собой биспецифическое антитело CD123хCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD123, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции биспецифическое антитело CD123хCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклональных антител, фрагментов scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ и F(v), мономеров или димеров тяжелой цепи, мономеров или димеров легкой цепи, и димеров, состоящих из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антагониста VLA-4.

В еще одном дополнительном варианте осуществления фармацевтической композиции ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антагониста VLA-4, выбранного из группы, состоящей из BIO1211, TCS2314, BIO5192 и TR14035.

В настоящем документе дополнительно предложен способ уничтожения раковых клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, представленной выше.

В дополнительном варианте осуществления способа рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.

В еще одном дополнительном варианте осуществления способа терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

В еще одном дополнительном варианте осуществления способа ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед терапевтическим средством для перенаправления Т-клетки.

В еще одном дополнительном варианте осуществления способа ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

В настоящем документе дополнительно обеспечен набор, содержащий фармацевтическую композицию, представленную выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Приведенное выше краткое описание, а также подробное описание и варианты осуществления настоящей заявки будут более понятны при изучении вместе с прилагаемыми формулой изобретения и графическими материалами. Однако необходимо понимать, что изобретение не ограничивается точными описаниями, раскрытыми в настоящем документе.

На Фиг. 1 показано, что наличие стромальных клеток позволяет защитить клеточные линии ОМЛ и ММ от перенаправленной цитотоксичности Т-клеток. Человеческие Т-клетки (40 000 клеток на лунку) культивировали с CFSE-мечеными клеточными линиями ОМЛ KG1 (A, B) или ММ H929 (C, D) в соотношении 2 : 1 в присутствии или в отсутствие стромальных клеток (HS-5, HS-27a, первичные МСК или эндотелиальные клетки CD105⁺; 20 000 клеток на лунку). Различные концентрации CD123 x CD3 (A, B) или BCMA x CD3 (C, D) добавляли к культурам на 48 часов.

Процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной цитометрии. Графики титрования дозы слева (А, В) показаны со средним значением $\pm$ стандартное отклонение (СО). Графики рассеяния справа (Б, Г) показывают данные для самой высокой концентрации биспецифического антитела (медианное значение внутри диапазона). Данные отражают результаты для трех или более экспериментов. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 2 показано, что стромальные клетки подавляют функцию Т-клетки, активируют сигнальные пути в опухолевых клетках и защищают опухолевые клетки от перенаправленной цитотоксичности Т-клетки. (А) человеческие Т-клетки (40 000 клеток на лунку) культивировали с CFSE-мечеными клетками KG-1 в соотношении 2 : 1 в присутствии или отсутствии стромальных клеток (HS-5, первичные МСК или эндотелиальные клетки CD105⁺; 20 000 клеток на лунку). Анализ маркеров ингибирования активации, эффекторов и контрольных точек в CD8⁺ Т-клетках проводили после добавления к культурам 33 нМ CD123 x CD3. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции количественно определяли с помощью проточной цитометрии через 48 часов. (Б) Иммуноблоттинг (фосфорилирования) PI3K и Akt, а также экспрессии Bcl-2 в клетках KG-1, культивируемых отдельно или в присутствии линии стромальных клеток HS-5 в течение 48 часов. (В) Аналогично А, но в данном случае все культуры обрабатывали с использованием Bcl-2i или без него и процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной цитометрии. (Г) Аналогично А и Б, где статус активации Т-клеток оценивали в культурах опухолевых и Т-клеток в отсутствие или в присутствии стромы и с обработкой Bcl-2i или без нее. Все представленные данные отражают результаты для трех или более экспериментов и показаны как среднее значение СО (кривые титрования дозы) или медианное значение внутри диапазона (графики рассеяния). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 3 показано, что стромальные клетки влияют на эффективность перенаправления CD3 *in vivo*. MOLM-13 AML и MOLM-13 со стромальными клетками костного мозга HS-5 (5 : 1) имплантировали подкожно самкам мышей NSG, инъецированным huPBMC, в день исследования 0. Мыши получали лечение CD123 x CD3 (8 мкг/кг), начиная с 5-го дня после имплантации опухолевых клеток, дважды в неделю, всего 5 процедур. Группы, получавшие фосфатно-солевой буфер (PBS), включали в качестве контроля. (А) Измерения среднего объема опухоли для всех групп в разные моменты времени. (Б) Процент инфильтрации CD8⁺ Т-клетки в опухолях

мышей в конце исследования (день 24). (В) Анализ маркеров ингибирования активации, эффекторов и контрольных точек в CD8⁺ Т-клетках в опухолях мышей на 24-й день. Все представленные данные отражают результаты для двух независимых экспериментов и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (станд. ош. среднего) (А) или как медианное значение внутри диапазона (Б и В). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 4 показано, что межклеточные контакты играют доминирующую роль в опосредовании иммуносупрессивного и защитного фенотипа стромальных клеток. (А) человеческие Т-клетки (40 000 клеток на лунку) культивировали с клетками OCI-AML5, меченными Incucyte NucLight® Red (20 000), с клетками HS-5, меченными Incucyte NucLight® Green, или без них (20 000 клеток на лунку) и обрабатывали биспецифическими антителами переменной концентрации в течение 72 часов. На репрезентативных изображениях показан моментальный снимок культур через 72 часа после добавления 11 нМ биспецифического антитела CD123 x CD3. (Б) Аналогично А, но в данном случае Т-клетки культивировали с CFSE-мечеными опухолевыми клетками со стромальными клетками или без них (HS-5 или первичные МСК) и обрабатывали биспецифическими антителами переменной концентраций в течение 48 часов. При проведении этих анализов стромальные клетки либо культивировали вместе, либо отделяли от опухоли и Т-клеток в транслунке. Процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной цитометрии. В настоящем документе представлены данные одного эксперимента, который является репрезентативным для 3 независимых биологических повторов. В настоящем документе данные представлены в виде среднего значения $\pm$ СО. (В) Проточный анализ маркеров активации и эффекторов на CD8⁺ Т-клетках в киллинг-анализах. Данные представлены в виде медианного значения внутри диапазона. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 5 показано, что ингибирование VLA-4 позволяет обратить вспять опосредованную стромой иммуносупрессию и защиту опухолевых клеток от перенаправленной цитотоксичности CD3 *in vitro*. Человеческие Т-клетки культивировали с CFSE-мечеными опухолевыми клетками, со стромальными клетками или без них (HS-5 или первичные МСК) и обрабатывали биспецифическими антителами переменной концентрации в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие нейтрализующих антител к VLA-4 или CXCR4. (А, Б) Процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной цитометрии. (В, Г)

Проточный анализ экспрессии гранзима В и CD25 на CD8⁺ Т-клетках в киллинг-анализах. Данные отражают результаты для трех или более экспериментов и представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (А, Б) и медианное значение внутри диапазона (В, Г). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 6 показано, что ингибирование VLA-4 позволяет обратить вспять опосредованную стромой иммуносупрессию и защиту опухолевых клеток от перенаправленной цитотоксичности CD3 *in vivo*. Клеточную линию ОМЛ MOLM-13 и MOLM-13 со стромальными клетками костного мозга HS-5 (5 : 1) имплантировали подкожно самкам мышей NSG, инъецированным huPBMC, в день 0 исследования. Мыши получали лечение CD123хCD3 (8 мкг/кг) либо отдельно, либо в комбинации с нейтрализующим антителом против VLA-4 (3 мг/кг). Группы, получавшие фосфатносолевой буфер (ФСБ), включали в качестве контроля. (А) Измерения среднего объема опухоли для всех групп в разные моменты времени. (Б) Анализ маркеров ингибирования активации, эффекторов и контрольных точек в CD8⁺ Т-клетках в опухолях мышей на 23-й день. Все представленные данные отражают результаты для двух независимых экспериментов и показаны как среднее значение $\pm$ SEM (А) и медианные значения внутри диапазона (Б). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$; с. н., статистически незначимо.

На Фиг. 7 показано, что ингибирование VLA-4 позволяет восстановить эффективность перенаправления CD3 в первичных культурах клеток ОМЛ и ММ *ex vivo*. PBMC из 3 первичных образцов ОМЛ (А, Б) или BMMC из 3 образцов ММ (В, Г) инкубировали с биспецифическими антителами в концентрации 1 мкг/мл в присутствии HS-5 и с нейтрализующими антителами против VLA-4 или без них в течение 72 часов. Медианные значения внутри диапазона показаны для цитотоксичности (А и В) или размножения Т-клеток CD8 (Б)/активации (Г) для всех 3 первичных образцов. * $p < 0,05$.

На Фиг. 8 показано, что CD123 х CD3 и BCMA х CD3 связывают опухолевые клетки, а также опосредуют уничтожение и активацию Т-клеток. (А) Клеточные линии CD123⁺ или BCMA⁺ окрашивали биспецифическими антителами переменной концентрации для охарактеризования профилей поверхностного связывания. Связывание биспецифического антитела обнаруживали посредством окрашивания мышиным антителом к IgG4 человека. (Б) Способность CD123 х CD3 и BCMA х CD3

опосредовать активацию Т-клеток (измеряемую по активизации CD25 и продукции гранзима b) и цитотоксичность клеточных линий опухоли CD123⁺ или BCMA⁺.

На Фиг. 9 показано, что наличие стромальных клеток позволяет защитить клеточные линии ОМЛ и ММ от перенаправленной цитотоксичности Т-клеток.

- 5 Человеческие Т-клетки культивировали с CFSE-мечеными клеточными линиями ОМЛ или ММ в соотношении 2 : 1 в присутствии или в отсутствие стромальных клеток (HS-5, HS-27a, первичные МСК или эндотелиальные клетки CD105⁺). Переменные концентрации CD123 x CD3 или BCMA x CD3 добавляли в культуры на 48 часов. Процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной
- 10 цитометрии. (А) Таблица, в которой представлена сводка значений EC50 CD123 x CD3 и BCMA x CD3 для опосредования цитотоксичности клеточной линии ОМЛ KG-1 и клеточной линии ММ H929 соответственно. (Б) Экспериментальная установка аналогична А, но в данном случае к культурам клеток KG-1-Т добавляли все большее количество клеток HS-5. (В) Оценивали способность CD123 x CD3 опосредовать
- 15 цитотоксичность клеточных линий ОМЛ OCI-AML5 и MOLM-13 в отсутствие или в присутствии стромы. (Г) Оценивали способность BCMA x CD3 опосредовать цитотоксичность клеточных линий ММ RPMI-8226 и MM.1S в отсутствие или в присутствии стромы.

- На Фиг. 10 показано, что присутствие стромальных клеток позволяет подавить
- 20 активацию и пролиферацию Т-клеток. (А) Человеческие Т-клетки культивировали с CFSE-меченой клеточной линией ММ H929 в соотношении 2 : 1 в присутствии или в отсутствие стромальных клеток (HS-5, HS-27a, первичные МСК или эндотелиальные клетки CD105⁺). Переменные концентрации BCMA x CD3 добавляли в культуры на 48 часов. Средние геометрические интенсивности флуоресценции маркеров
- 25 активации Т-клеток количественно определяли с помощью проточной цитометрии через 48 часов после обработки биспецифическими антителами. (Б) Аналогично А, но в данном случае CFSE-меченые Т-клетки представляли собой культуры с немечеными линиями опухолевых клеток в соотношении 2 : 1 в присутствии или отсутствии стромальных клеток (HS-5, первичные МСК или эндотелиальные клетки CD105⁺).
- 30 Анализы FACS, демонстрирующие наложение профилей разведения CFSE (нуль x CD3 контроль — заштрихованная область, а экспериментальная группа — черные гистограммы), показывают пролиферацию Т-клеток.

На Фиг. 11 показано, что лечение ингибитором Bcl-2 позволяет блокировать экспрессию Bcl2. Иммуноблоттинг экспрессии Bcl-2 в клетках KG-1, культивируемых в

присутствии линии стромальных клеток HS5 и обработанных Bcl-2i или без него в течение 48 часов.

На Фиг. 12 показано, межклеточный контакт и путь адгезии VLA-4 играют роль в опосредованном стромой подавлении цитотоксичности в клетках MOLM-13. (А)

5 Человеческие Т-клетки культивировали с CFSE-мечеными клетками MOLM-13 или без HS-5 или первичных МСК и обрабатывали биспецифическим антителами переменной концентрации в течение 48 часов. При проведении этих анализов стромальные клетки либо культивировали вместе, либо отделяли от опухоли и Т-клеток в транслунке. Процент мертвых клеток CFSE⁺ количественно определяли с помощью проточной
10 цитометрии. (Б) Аналогично А, но в данном случае цитотоксичность оценивали, когда все клетки культивировали вместе и в присутствии или в отсутствие нейтрализующих антител к VLA-4 или CXCR4.

На Фиг. 13 показано, что обработка нейтрализующим антителом VLA-4 позволяет снизить фосфорилирование путей АКТ и PI3K. Иммуноблоттинг экспрессии
15 pAkt и pPI3K в клетках KG-1, культивируемых в присутствии линии стромальных клеток HS5 и обработанных нейтрализующими антителами к VLA4 или без них в течение 48 часов.

На Фиг. 14 показана стратегия гейтирования для первичных образцов пациентов с ОМЛ. Стратегия гейтирования для экспериментов *ex vivo* проводилась с
20 использованием первичных образцов пациентов с ОМЛ. Соответствующие контроли изотипов показаны сбоку. (А) Бласты CD123⁺ идентифицировали посредством первого стробирования прямого рассеяния (FSC) и бокового рассеяния (SSC) для выделения интересующих клеток. Впоследствии гейтировали живые клетки CD45⁺, после чего гейтировали бласты CD38⁺ CD33⁺. Затем в различных условиях количественно
25 определяли бласты, экспрессирующие CD123. (Б) Для количественной оценки размножения Т-клеток в образцах интересующие клетки с SSC/FSC сначала подвергали гейтированию и впоследствии идентифицировали живые клетки CD45⁺. Впоследствии идентифицировали CD4⁺CD8⁻ и CD8⁺CD4⁻ клетки на основе окрашивания CD4 и CD8.

На Фиг. 15 показана стратегия гейтирования для первичных образцов пациентов
30 с ММ. Стратегия гейтирования для экспериментов *ex vivo* проводилась с использованием первичных образцов пациентов с ММ. Соответствующие контроли изотипов показаны сбоку. (А) Клетки CD138⁺ идентифицировали посредством первого гейтирования на FSC/SSC для выделения интересующих клеток. Впоследствии определяли количество живых клеток CD138⁺ в различных условиях. (Б) Для

количественной оценки активации Т-клеток в образцах сначала были отобраны лимфоциты с SSC/FSC, а затем были идентифицированы живые клетки CD138⁻. Впоследствии измеряли экспрессию CD25 на CD8⁺ Т-клетках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 5 В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения.
- 10 Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.
- Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к
- 15 которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании.
- Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.
- 20 Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом
- 25 диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.
- 30 Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов

осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в изобретение.

В настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любая
5 другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит
10 перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не к
15 исключающему «или». Например, условие «А или В» выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует), и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий как отдельные, так и
20 комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного
25 документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

В настоящем документе термин «состоять из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения,
30 указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В настоящем документе термин «состоять по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в

описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. В настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п. и более предпочтительно человека.

Слова «правый», «левый», «нижний» и «верхний» обозначают направления на чертежах, на которые сделана ссылка.

Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «по существу», «главным образом» и подобные термины, используемые в данном документе при упоминании размера или характеристики компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или аналогичны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Используемый в настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые

кислоты, пептиды и белки, полученные посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты»,

относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или

модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и

двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и

РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того,

«полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК,

содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей.

«Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически,

ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК,

характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

В настоящем документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

В настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты изобретения. Термин «клетка-хозяин»

может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-

хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты изобретения. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой

трансфицированной или трансдуцированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

5 Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения.

10 В контексте настоящего документа термин «антитела» подразумевается в широком значении и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела (в том числе мышиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела), антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, 15 тетраспецифические, и т. д., димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными 20 связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области 25 гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от аминок- к карбокси-концу в следующем порядке: в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулины FR1, CDR1, 30 FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4 могут относиться к пяти основным классам — IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа (κ) и лямбда (λ).

В контексте настоящего документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или дезамидирование глутамина. Моноклональные антитела, как правило, связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческие антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой

генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57–86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385–96 и межд. патентной публ. № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере одна CDR получена от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

В контексте настоящего документа термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу свободно от иных клеточных материалов и/или химических веществ, и включает антитела, которые выделены с более высокой чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

В контексте настоящего документа термин «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно полученные или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, вариабельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда

домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и

5 Термин «биспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например таким же антигеном от других видов (гомологов),

10 таких как человек или обезьяна, например *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабод) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

В контексте настоящего документа термин «мультиспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает по меньшей мере два разных антигена или

15 по меньшей мере два разных эпитопа в пределах одного и того же антигена. Мультиспецифическое антитело может связываться, например, с двумя, тремя, четырьмя или пятью разными антигенами или разными эпитопами в пределах одного и того же антигена.

Термины «специфическое связывание», или «иммуноспецифическое

20 связывание», или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и предпочтительно отсутствие связывания с другими молекулами в пробе, содержащей смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело

25 связывается с родственным антигеном с K_d менее около 1×10^{-8} М, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками.

Термин «рак» обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме.

30 Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль.

В контексте настоящего документа термин «комбинация» означает, что субъекту введены два или более терапевтических средства вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

В контексте настоящего документа термин «усиливать» или «усиленный»
5 относится к усилению одной или более функций исследуемой молекулы по сравнению с контрольной молекулой или комбинации исследуемых молекул по сравнению с одной или более контрольными молекулами. Примерами функций, которые можно измерить, являются уничтожение опухолевых клеток, активация Т-клеток, относительное или абсолютное число Т-клеток, опосредованная Fc эффекторная функция (например, ADCC, CDC и/или ADCP) или связывание с Fcγ-рецептором (FcγR) или FcRn. Термин
10 «усиленный» может означать усиление на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более или статистически значимое усиление.

В контексте настоящего документа термин «мутация» относится к сконструированному изменению или изменению природного происхождения в
15 полипептидной или полинуклеотидной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью. Изменение может представлять собой замену, вставку или делецию одной или более аминокислот или полинуклеотидов.

В контексте настоящего документа термин «несвязанная комбинация» относится к отдельным фармацевтическим композициям терапевтического средства для
20 перенаправления Т-клетки и ингибитора пути адгезии VLA-4, вводимым в виде отдельных элементов одновременно, параллельно или последовательно без конкретных ограничивающих временных рамок, причем такое введение обеспечивает эффективные концентрации двух соединений в теле субъекта.

В контексте настоящего документа термин «фармацевтическая композиция»
25 относится к композиции, которая содержит активный ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель.

В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «эксципиент» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, за исключением активного ингредиента, который нетоксичен для
30 испытуемого.

В контексте настоящего документа термин «рекомбинантный» относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

В контексте настоящего документа термин «снижать» или «сниженный» относится к снижению одной или более функций исследуемой молекулы по сравнению с контрольной молекулой или комбинации исследуемых молекул по сравнению с одной или более контрольными молекулами. Примерами функций, которые можно измерить, являются уничтожение опухолевых клеток, активация Т-клеток, относительное или абсолютное число Т-клеток, опосредованная Fc эффекторная функция (например, ADCC, CDC и/или ADCP) или связывание с Fcγ-рецептором (FcγR) или FcRn. Термин «снижение» может означать снижение на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более, или статистически значимое улучшение.

В контексте настоящего документа термин «рефрактерный» относится к раку, который не поддается хирургическому вмешательству и изначально невосприимчив к терапии.

В контексте настоящего документа термин «рецидивирующий» относится к раку, который отвечал на лечение, но затем вернулся.

В контексте настоящего документа термин «субъект» включает человека или не относящееся к человеку животное, термин «не относящееся к человеку животное» включает всех позвоночных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. д. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» применяются взаимозаменяемо.

В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, которые включают, например, улучшенное самочувствие пациента.

В контексте настоящего документа термины «лечить» или «лечение» обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Преимущественные или желательные клинические результаты включают ослабление симптомов,

уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемым, если субъект не получал лечения. Требуемые лечения пациенты включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто имеет предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у кого такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

В контексте настоящего документа термин «опухолевая клетка» или «раковая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией от трансформирующего вируса и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты или она может также возникать спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Терапевтические средства для перенаправления Т-клетки

Терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки (также именуемое «перенаправляющее Т-клетки биспецифическое антитело» или «биспецифическое антитело»), описанное в настоящем документе, представляет собой молекулу, содержащую две или более связывающих области, причем одна из связывающих областей специфически связывается с антигеном клеточной поверхности (таким как опухолеассоциированный антиген (ТАА)) на клетке-мишени или ткани, и при этом вторая связывающая область молекулы специфически связывается с поверхностным антигеном Т-клетки (таким как CD3). Такая способность связываться с двумя или множеством мишеней рекрутирует Т-клетки к клетке-мишени или ткани, что приводит к уничтожению клетки-мишени или ткани.

В контексте настоящего документа терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки может представлять собой антитело, белок, полученный из антитела, или, например, рекомбинантный белок, имеющий антигенсвязывающие сайты. В одном варианте осуществления терапевтические средства для

5 перенаправления Т-клетки, описанные в настоящем документе, представляют собой биспецифические антитела, охватывающие «полные» антитела, такие как полные IgG или IgG-подобные молекулы, и небольшие рекомбинантные форматы, такие как тандемные молекулы одноцепочечных вариабельных фрагментов (taFv), диатела (Db), одноцепочечные диатела (scDb) и различные другие их производные (ср. форматы

10 биспецифических антител, описанные Byrne H. et al. (2013 г.) Trends Biotech, 31 (11): 621–632 с ФИГ. 2, где показаны различные форматы биспецифических антител; Weight U. H. et al. (2013 г.) Cancer Genomics and Proteomics 10: 1–18, в частности с ФИГ. 1, где показаны различные форматы биспецифических антител; и Chan, a. C. and Carter, p. J. (2010 г.) Nat Rev Immu 10: 301–316, с ФИГ. 3, где показаны различные форматы

15 биспецифических антител). Примеры форматов биспецифических антител включают, без ограничений, квадному, химически связанный Fab (антигенсвязывающий фрагмент) и BiTE® (привлекающий Т-клетки биспецифический активатор).

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, используемое в настоящем документе, может быть выбрано из группы, содержащей антитела Triomab;

20 гибридную гибридому (квадному); мультиспецифическую антикалиновую платформу (Pieris); димерные тела (диабоди); одноцепочечные диатела; тандемные одноцепочечные фрагменты Fv; тандемные антитела TandAb, триспецифические антитела (Affimed) (105–110 кДа); Dart (переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью; MacroGenics); биспецифические антитела Xmab (Xencor); привлекающие

25 Т-клетки биспецифические активаторы (Bites; Amgen; 55 кДа); тримерные тела; Tribody = Fab-scFv белок слияния (Creative Biolabs) многофункциональные производные рекомбинантных антител (110 кДа); платформу Duobody (Genmab); платформу для взаимодействия по типу «связывание и закрепление» (Dock and Lock); платформу КИН (взаимодействие по типу «выступы во впадины»); гуманизированное биспецифическое

30 антитело IgG (REGN1979) (Regenon); биспецифические антитела Mab2 (F-Star); DVD - Ig = иммуноглобулин с двойным вариабельным доменом (Abbvie); цепи каппа-лямбда; четырехвалентный биспецифический тандемный Ig; и CrossMab.

В дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть выбраны из биспецифических IgG-

подобных антител (BsIgG), содержащих CrossMab; DAF (два в одном); DAF (четыре в одном); DutaMab; DT-IgG; общую легкую цепь (LC) с взаимодействием по типу «выступы во впадины»; узел с взаимодействием по типу «выступы во впадины»; пару с зарядом; обмен Fab-arm; SEEDbody; Triomab; LUZ-Y; Fcab; $\kappa\lambda$ -body; и ортогональный Fab. Эти форматы биспецифических антител показаны и описаны, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть выбраны из антител, присоединенных к IgG с дополнительным антигенсвязывающим остатком, содержащим DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFv-(L)IgG; IgG(L,H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zyboby; и DVI-IgG (четыре в одном). Эти форматы биспецифических антител показаны и описаны, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть выбраны из фрагментов биспецифических антител, содержащих Nanobody; нанотело-HAS; BiTE; димерное тело (диабоди); DART; TandAb; scDiabody; sc-Diabody-CH3; Diabody-CH3; тримерное тело; мини-антитело; мини-тело; тримерные мини-тела TriBi; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')₂; F(ab')₂-scFv₂; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; четырехвалентное антитело HCAB; scDiabody-Fc; Diabody-Fc; тандем scFv-Fc; и интратело. Эти форматы биспецифических антител показаны и описаны, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть выбраны из биспецифических гибридных белков, содержащих платформу для взаимодействия по типу «связывание и закрепление»; ImmTAC; HSAbody; scDiabody-HAS; и тандемный scFv-токсин. Эти форматы биспецифических антител показаны и описаны, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть выбраны из конъюгатов биспецифических антител, содержащих IgG-IgG; Cov-X-Body; и scFv1-PEG-scFv2. Эти форматы биспецифических антител показаны и описаны, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут быть получены на основе иммуноглобулинов любого класса (например, IgA, IgG, IgM и т. д.) и подкласса (например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т. д.). В одном аспекте биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут иметь IgG-подобный формат (на основе IgG или «типа IgG»), который обычно содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Примеры антител, имеющих IgG-подобный формат, включают квадному и различные форматы IgG-scFv (cf: Byrne H. et al. (2013 г.) *Trends Biotech*, 31 (11): 621–632; см. ФИГ. 2А–Д), причем предпочтительной является квадрома, которую предпочтительно получают посредством слияния двух разных гибридом. В классе IgG биспецифические антитела могут быть основаны на подклассах IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В еще одном дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, представлены в форматах IgG-подобных антител, которые содержат, например, гибридные гибридомы (квадромы), «выступы в отверстия» с общей легкой цепью, различные форматы IgG-scFv, различные форматы scFv-IgG, IgG «два в одном», IgG с двойным V-доменом, IgG-V и V-IgG, которые показаны, например, на ФИГ. 3в Chan, A. C. and Carter, P. J. (2010) *Nat Rev Immu* 10: 301–316 и описаны в упомянутой публикации. Дополнительные примеры форматов биспецифических IgG-подобных антител включают, например, DAF, CrossMab, IgG-dsscFv, DVD, IgG-dsFV, IgG-scFab, scFab-dsscFv и Fv2-Fc, которые показаны на ФИГ. 1А в Weidle U. H. et al. (2013 г.) *Cancer Genomics and Proteomics* 10: 1–18 и описаны в упомянутой публикации. Еще один дополнительный пример форматов биспецифических IgG-подобных антител включает DAF (два в одном); DAF (четыре в одном); DutaMab; DT-IgG; узел с взаимодействием по типу «выступы во впадины»; пару с зарядом; обмен Fab-arm; SEEDbody; Triomab; LUZ-Y; Fcab; κλ-body; ортогональный Fab; DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFV-(L)IgG; IgG(L,H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-

2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zybody; и DVI-IgG (четыре в одном), как показано и описано, например, в Spiess C., Zhai Q. and Carter P. J. (2015 г.) *Molecular Immunology* 67: 95–106, в частности, см. ФИГ. 1 и соответствующее описание, например на стр. 95–101.

Биспецифические антитела, например, могут быть получены тремя различными способами: (i) химическая конъюгация, которая включает химическое поперечное сшивание; (ii) слияние клеточных линий двух различных гибридом; или (iii) генетические подходы, включающие технологию рекомбинантной ДНК. В результате слияния двух различных гибридом образуется гибрид-гибридома (или «квадрома»), секретирующая гетерогенную популяцию антител, включая биспецифические молекулы. Альтернативные подходы включали химическую конъюгацию двух различных mAb и/или более мелких фрагментов антител. Было обнаружено, что стратегии окислительной реассоциации для связывания двух различных антител или фрагментов антител неэффективны из-за наличия побочных реакций во время повторного окисления множества нативных дисульфидных мостиков. В современных способах химической конъюгации в основном применяются гомо- или гетеробифункциональные сшивающие реагенты. Технология рекомбинантной ДНК позволила получить наибольшее количество биспецифических антител путем искусственного манипулирования генами и представляет собой наиболее разнообразный подход к созданию биспецифических антител (45 форматов за последние два десятилетия; ср. Byrne H. et al. (2013 г.) *Trends Biotech*, 31 (11): 621–632).

В частности, за счет применения такой технологии рекомбинантной ДНК недавно было создано множество дополнительных мультиспецифических антител. Термин «мультиспецифические антитела» относится к белкам, имеющим более одного паратопа и способность связываться с двумя или более различными эпитопами. Таким образом, термин «мультиспецифические антитела» включает биспецифические антитела, как определено выше, но, как правило, также белок, например антитело, каркасы, которые связываются, в частности, с тремя или более различными эпитопами, т. е. антителами с тремя или более паратопами. Такие мультиспецифические белки, в частности, с тремя или более паратопами, как правило, получают методами рекомбинантной ДНК. В контексте настоящего изобретения антитело, в частности, может иметь более двух специфичностей, и, таким образом, более двух паратопов, поскольку в соответствии с настоящим изобретением требуются по меньшей мере два паратопа, например один для клетки-мишени и другой для Т-клетки. Соответственно, антитело может иметь дополнительные паратопы, в частности, относящиеся к

дополнительным специфичностям, в дополнение к двум паратопам. Таким образом, настоящее изобретение также включает мультиспецифические антитела. Таким образом, следует понимать, что изобретение не ограничивается биспецифическими антителами, хотя в настоящем документе оно относится, в частности, к

- 5 биспецифическим антителам, которые отвечают минимальным требованиям. Следовательно, то, что в настоящем документе сказано о биспецифических антителах, также может быть применимо к мультиспецифическим антителам.

- 10 Биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, как определено выше, способны перенаправлять эффекторные клетки против клеток-мишеней, которые играют ключевую роль в патологических процессах. В частности, перенаправляющие Т-клетки биспецифические антитела, используемые в настоящем документе, могут, например, связываться с комплексами Т-клеточных рецепторов (TCR) и «перенаправлять» Т-клетки на клетки-мишени, такие как, например, опухолевые клетки. Для этого такие биспецифические антитела, используемые в настоящем
- 15 документе, как правило, имеют по меньшей мере одну специфичность, например по меньшей мере один паратоп для рекрутирования Т-клеток, который специфичен в отношении Т-клеток, предпочтительно в отношении поверхностных антигенов Т-клеток, например CD3, и по меньшей мере еще одну специфичность, например по меньшей мере один паратоп для направления Т-клеток на опухолевые клетки, который
- 20 специфичен для опухолевых клеток, предпочтительно ТАА на опухолевых клетках. Такое «перенаправление» Т-клетки на опухолевую клетку с помощью биспецифического антитела для перенаправления Т-клетки, как правило, приводит к опосредованному Т-клеткой уничтожению опухолевой клетки.

- 25 В одном варианте осуществления терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, используемое в настоящем документе, содержит первую область связывания со специфичностью в отношении поверхностного антигена Т-клетки и вторую область связывания со специфичностью в отношении ТАА на опухолевой клетке.

- 30 В дополнительном варианте осуществления поверхностный антиген Т-клетки может быть выбран из CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, CD40L, CD44, CD137, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 и NKG2C. Или поверхностный антиген Т-клетки представляет собой CD3.

В еще одном дополнительном варианте осуществления ТАА может быть выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), CD123, GPRC5D, CD33, CD19, PSMA,

TMEFF2, CD20, CD10, CD21, CD22, CD25, CD30, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD52, CD133, ROR1, B7-H6, B7-H3, HM1.24, SLAMF7, Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT-3, CD135), хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4, ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), Her2, Her3, IGFR, IL3R, белка активации фибробластов (FAP), CDCP1, Derlin1, тенасцина, frizzled 1–10, VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR-альфа (CD140a), PDGFR-бета (CD140b), эндоглин, CLEC14, Tem1-8 или Tie2. Дополнительные примеры ТАА на опухолевой клетке включают A33, CAMPATH-1 (CDw52), карбоэмбриональный антиген (CEA), карбоангидразу IX (MN/CA IX), de2-7, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, фолат-связывающий белок, G250, c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, рецептор IL-2, IL3R, MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан клеточной поверхности), Мис-1, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический антиген (PSA), hK2, TAG-72 или неоантиген клеток опухоли. Или ТАА может быть выбран из BCMA, CD123, GPRC5D, CD33, CD19, PSMA, TMEFF2, CD20, CD22, CD25, CD52, ROR1, HM1.24, CD38 и SLAMF7. Или ТАА может быть выбран из BCMA или CD123.

В одном варианте осуществления терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело BCMAxCD3, которое иммуноспецифически связывается с клетками BCMA⁺ ММ и Т-клетками CD3. Биспецифические антитела BCMAxCD3 могут быть выбраны из описанных в WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058, WO2012143498, WO2013072406, WO2013072415, WO2014122144 и US10,072,088, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело BCMAxCD3 представляет собой биспецифическое антитело DuoBody®, как описано в заявке US10,072,088, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Биспецифическое антитело BCMAxCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), в которой пара HC1 и LC1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3. В одном варианте осуществления антитело BCMAxCD3 включает HC1, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, LC1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HC2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 3, и LC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, причем пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3. В одном варианте осуществления антитело BCMAxCD3 включает HC1, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, LC1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и LC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, причем пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

В одном варианте осуществления терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело CD123xCD3, которое иммуноспецифически связывается с клетками ОМЛ CD123⁺ и Т-клетками CD3. Биспецифическое антитело CD123xCD3 может представлять собой биспецифическое антитело DuoBody®, как описано в заявке US9,850,310, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. В одном варианте осуществления антитело CD123xCD3 содержит HC1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, причем пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD123, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

SEQ ID NO: 1

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISKNSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSM
 YYSGSTYYNSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGGASI
 FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 2

5 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDMDACWYQQRPGQSPVVVIYQDSER
PSGIPERFAGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGV
ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 3

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI
RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHG
NFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTC
15 NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
EVTCTVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 4

20 QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG
TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG
TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS
25 PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS

SEQ ID NO: 5

30 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGL
FDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCTVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG

KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

5 SEQ ID NO: 6

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSD
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVK
AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

10 SEQ ID NO: 7

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGIID
PSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDL
DYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

20 SEQ ID NO: 8

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

30 SEQ ID NO: 9

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI
RSKYNAYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHG
NFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTC

NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP
 EVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDK
 5 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 10

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG
 TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG
 10 TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS
 PVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
 VAPTECS

Ингибитор пути адгезии VLA-4

15 Очень поздний антиген-4 (VLA-4), также известный как $\alpha 4\beta 1$, является членом семейства интегринов $\beta 1$ рецепторов клеточной поверхности. VLA-4 содержит цепь $\alpha 4$ и цепь $\beta 1$ и участвует в межклеточных взаимодействиях. Его экспрессия главным образом ограничена лимфоидными и миелоидными клетками. Он играет ключевую роль в клеточной адгезии. Исследования также показали, что VLA-4 играет важную
 20 роль в опосредовании взаимодействия стромы ОМЛ/ММ в КМ. Васкулярная молекула-1 клеточной адгезии (VCAM-1) (экспрессируемая остеобластами и эндотелиальными клетками) и фибронектин (компонент внеклеточного матрикса) являются двумя лигандами для VLA-4.

25 Ингибиторы пути адгезии VLA-4, используемые в настоящем документе, могут представлять собой любую молекулу, способную блокировать путь адгезии, опосредованный VLA-4.

Например, ингибиторы пути адгезии VLA-4, используемые в настоящем документе, могут представлять собой антитело к VLA-4 или фрагменты, связывающие VLA-4, полученные из антитела к VLA-4, такие как Fab, Fab', F(ab')₂ и F(v); мономеры или димеры тяжелой цепи; мономеры или димеры легкой цепи; и димеры, состоящие из
 30 одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, также рассматриваются в настоящем документе. Такие фрагменты антител могут быть получены химическими способами, например посредством расщепления интактного антитела протеазой, такой как пепсин или папаин, или методиками рекомбинантной ДНК, например, с использованием

клеток-хозяев, трансформированных генами усеченного тяжелой и/или легкой цепи. Мономеры тяжелой и легкой цепей аналогичным образом могут быть получены посредством обработки интактного антитела восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол или β -меркаптоэтанол, или с помощью клеток-хозяев,

5 трансформированных ДНК, кодирующей желаемую тяжелую цепь или легкую цепь, или обе, или, например, моноклональное антитело или фрагмент этого антитела.

В контексте настоящего документа могут быть использованы любые приемлемые антитела к VLA-4 или фрагменты, связывающие VLA-4 и способные блокировать путь адгезии, опосредованный VLA-4, которые включают, без
10 ограничений, натализумаб и антитела, описанные в патенте США № 6,602,503, и публикации заявки на патент США № US20140161794 A1, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

В определенных вариантах осуществления ингибиторы пути адгезии VLA-4, используемые в настоящем документе, могут представлять собой антагонистов VLA-4,
15 способных блокировать путь адгезии, опосредованный VLA-4. Типичные антагонисты VLA-4, используемые в настоящем документе, включают, без ограничений, антагонистов VLA-4 от Tocris Bioscience (например, BIO1211, TCS2314, BIO5192 и TR14035).

Поскольку VCAM-1 и фибронектин являются лигандами VLA-4, ингибиторы
20 пути адгезии VLA-4 также могут включать антагонистов (включая антитела) VCAM-1 или фибронектина.

Фармацевтические композиции

Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции,
25 содержащие терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное выше, и ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Полинуклеотиды, полипептиды, клетки-хозяева и/или сконструированные иммунные клетки изобретения и содержащие их композиции также используют при производстве лекарственного препарата для терапевтических целей,
30 упомянутых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представляют собой отдельные композиции, содержащие терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное выше, и ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель. В других вариантах осуществления фармацевтические

композиции не являются отдельными композициями, и фармацевтические композиции содержат терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное выше, и ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

5 В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что
10 характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывают негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами
15 осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно применять любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции полинуклеотидов, полипептидов, клеток-хозяев и/или сконструированных иммунных клеток.

20 Состав, содержащий фармацевтически активные ингредиенты с фармацевтически приемлемыми носителями, известен в данной области техники, например в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, издание 21 (2005) и любые последующие издания). Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных ингредиентов включают: буферные растворы, разбавители,
25 растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций изобретения.

В одном варианте осуществления описания фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава
30 является водный состав, т. е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно готовить в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, посредством инъекционного устройства (например, шприца или инфузионной помпы).

Например, инъекция может быть доставлена подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, интравитреально или внутривенно.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно применять в состоянии как есть или к которой врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением.

Способы применения

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, описанные в настоящем документе.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу уничтожения раковых клеток, включающему воздействие на раковые клетки композициями, содержащими терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, описанные в настоящем документе.

У субъекта может быть недавно диагностирован рак или рецидив или рефрактерность к предшествующей противораковой терапии. Рак может представлять собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективное количество терапевтического средства для перенаправления Т-клетки и ингибитора пути адгезии VLA-4, описанных в настоящем документе. Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество», используемый применительно к терапевтическому средству для перенаправления Т-клетки и ингибитору пути адгезии VLA-4, означает количество терапевтического средства для перенаправления Т-клетки в комбинации с ингибитором пути адгезии VLA-4, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, в контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество», используемый применительно к терапевтическому средству

для перенаправления Т-клетки, означает количество терапевтического средства для перенаправления Т-клетки с ингибитором пути адгезии VLA-4, которое обеспечивает лечение заболевания, расстройства или состояния; предотвращение или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает, или

5 полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, расстройством или состоянием.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени,

10 физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

15 В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, могут иметь состав, благодаря которому они приемлемы для предполагаемого способа введения субъекту. Например, описанные в данном документе композиции могут иметь состав, благодаря которому они приемлемы для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

20 В контексте данного документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, относящегося к злокачественному новообразованию, который не обязательно очевиден у субъекта, но может быть видимым у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также

25 обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием,

30 расстройством или патологическим состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание,

расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления обеспечены фармацевтические композиции, используемые в лечении рака. Для терапии рака обеспеченные фармацевтические композиции можно применять в комбинации с другим лечением, включая, без ограничений, химиотерапию, mAb к антителу к CD20, mAb к антителу к TIM-3, mAb к антителу к LAG-3, mAb к антителу к EGFR, mAb к антителу к HER-2, mAb к антителу к CD19, mAb к антителу к CD33, mAb к антителу к CD47, mAb к антителу к CD73, mAb к антителу к DLL-3, mAb к антителу к апелину, mAb к антителу к TIP-1, mAb к антителу к FOLR1, mAb к антителу к CTLA-4, mAb к антителу к PD-L1, mAb к антителу к PD-1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенный агент, лучевую терапию, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC), таргетную терапию или другие противораковые лекарственные средства.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту терапевтического средства для перенаправления Т-клетки в комбинации с ингибитором пути адгезии VLA-4, описанными в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанное в настоящем документе терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки) можно вводить перед (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства (например, ингибитора пути адгезии VLA-4) субъекту.

Наборы

В другом общем аспекте в настоящем документе обеспечены наборы, единичные дозированные формы и изделия, содержащие терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное в настоящем документе, ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный в настоящем документе, и необязательно фармацевтический носитель. В определенных вариантах осуществления набор предпочтительно предоставляет инструкции по его применению.

В другом конкретном аспекте в настоящем документе обеспечены наборы, содержащие (1) терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное в настоящем документе, и (2) ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный в данном документе.

В другом конкретном аспекте в настоящем документе обеспечены наборы, содержащие фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, и (1) терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки, описанное в настоящем документе, и (2) ингибитор пути адгезии VLA-4, описанный в настоящем документе.

Варианты осуществления

Вариант 1 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции, содержащие терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, причем терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки содержит первую связывающую область, которая иммуноспецифически связывается с поверхностным антигеном Т-клетки, и вторую связывающую область, которая иммуноспецифически связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА).

Вариант 2 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 1 осуществления, дополнительно содержащие фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант 3 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантами 1 или 2 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант 4 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–3 осуществления, в которых поверхностный антиген Т-клеток выбран из группы, состоящей из CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, CD40L, CD44, CD137, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 и NKG2C.

Вариант 5 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 4 осуществления, в которых поверхностный антиген Т-клеток представляет собой CD3.

Вариант 6 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–5 осуществления, в которых ТАА выбран из группы, состоящей из BCMA, CD123, GPRC5D, CD33, CD19, PSMA, TMEFF2, CD20, CD22, CD25, CD52, ROR1, HM1.24, CD38 и SLAMF7.

Вариант 7 осуществления включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 6 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело BCMAxCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

Вариант 8 осуществления включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 7 осуществления, в которых биспецифическое антитело BCMAxCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, и пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.

Вариант 9 осуществления включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 8 осуществления, в которых HC1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 1, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HC2 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5 Вариант 10 осуществления включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 8 осуществления, в которых HC1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 5, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

10

Вариант 11 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 6 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело CD123хCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически
15 связывается с CD123, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

Вариант 12 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 11 осуществления, в которых биспецифическое антитело
20 CD123хCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.

25 Вариант 13 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 12 осуществления, в которых HC1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 7, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и LC2 содержит аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO: 10.

Вариант 14 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–13 осуществления, в которых ингибитор пути

адгезии VLA-4 представляет собой антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент.

- 5 Вариант 15 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 14 осуществления, в которых антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклональных антител, фрагментов scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ и F(v), мономеров и димеров тяжелой цепи, мономеров и димеров легкой цепи, и димеров, состоящих из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи.
- 10 Вариант 16 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции по любому из вариантов 1–13 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антагониста VLA-4.
- 15 Вариант 17 осуществления изобретения включает фармацевтические композиции в соответствии с вариантом 16 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антагониста VLA-4, выбранного из группы, состоящей из BIO1211, TCS2314, BIO5192 и TR14035.
- 20 Вариант 18 осуществления изобретения включает способы уничтожения раковых клеток, включающие воздействие на раковые клетки терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.
- 25 Вариант 19 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 18 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клеток и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.
- 30 Вариант 20 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 19 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 21 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 20 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 5 Вариант 22 осуществления изобретения включает способы уничтожения раковых клеток, включающие разрыв межклеточного контакта между раковыми клетками и стромальными клетками, включающие воздействие на раковые клетки терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем раковые клетки подвергаются некоторой форме
- 10 гибели клеток.

Вариант 23 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 22 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

- 15 Вариант 24 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 22 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 20 Вариант 25 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 22 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- Вариант 26 осуществления включает способы уничтожения раковых клеток,
- 25 включающие увеличение Т-клеточно-зависимой цитотоксичности, включая воздействие на раковые клетки терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.

- 30 Вариант 27 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 26 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клеток и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

Вариант 28 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 26 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 5 Вариант 29 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 26 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 10 Вариант 30 осуществления изобретения включает способы уничтожения раковых клеток, включающие разрыв межклеточного контакта между раковыми клетками и стромальными клетками и увеличение Т-клеточно-зависимой цитотоксичности, включающие воздействие на раковые клетки терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.

- 15 Вариант 31 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 30 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

- 20 Вариант 32 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 30 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 25 Вариант 33 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 30 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 30 Вариант 34 осуществления изобретения включает способы изменения иммуносупрессии в микроокружении опухоли, включающие воздействие на микроокружение опухоли терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем иммуносупрессия снижается в микроокружении опухоли, а раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.

Вариант 35 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 34 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

- 5 Вариант 36 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 34 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 10 Вариант 37 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 34 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 15 Вариант 38 осуществления изобретения включает способы изменения иммуносупрессии в микроокружении опухоли, включающие разрыв межклеточного контакта между раковыми клетками и стромальными клетками, включая воздействие на микроокружение опухоли терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем иммуносупрессия снижается в микроокружении опухоли, а раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.

- 20 Вариант 39 осуществления включает способы в соответствии с вариантом 38 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

- 25 Вариант 40 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 38 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

- 30 Вариант 41 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 38 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 42 осуществления изобретения включает способы изменения иммуносупрессии в микроокружении опухоли, включающие увеличение Т-клеточно-

зависимой цитотоксичности, включая воздействие на микроокружение опухоли терапевтически эффективных количеств фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем иммуносупрессия снижается в микроокружении опухоли, а раковые клетки подвергаются некоторой

5 форме гибели клеток.

Вариант 43 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 42 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

10

Вариант 44 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 42 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

15 Вариант 45 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 42 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 46 осуществления изобретения включает способы изменения

20 иммуносупрессии в микроокружении опухоли, включающие разрыв межклеточного контакта между раковыми клетками и стромальными клетками и увеличение Т-клеточно-зависимой цитотоксичности, включая воздействие на микроокружение опухоли терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления, причем иммуносупрессия

25 снижается в микроокружении опухоли, а раковые клетки подвергаются некоторой форме гибели клеток.

Вариант 47 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 46 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клеток и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

30

Вариант 48 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 46 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 49 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 46 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

5

Вариант 50 осуществления изобретения включает способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1–17.

10 Вариант 51 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 50 осуществления, в которых у субъекта диагностирован рак.

Вариант 52 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 51 осуществления, в которых субъект имеет рецидив или рефрактерность к
15 предыдущей противораковой терапии.

Вариант 53 осуществления изобретения включает способы по любому из вариантов 50–52 осуществления, в которых рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.

20

Вариант 54 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 53 осуществления, в которых субъект имеет ОМЛ или ММ.

Вариант 55 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантами
25 50–54 осуществления, в которых терапевтическое средство для перенаправления Т-клеток и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.

Вариант 56 осуществления включал способы в соответствии с вариантом 55 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят перед введением
30 терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 57 осуществления изобретения включает способы в соответствии с вариантом 55 осуществления, в которых ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

Вариант 58 осуществления изобретения включает наборы, содержащие фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления изобретения.

5

Вариант 59 осуществления изобретения включает наборы, содержащие фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления изобретения, причем фармацевтические композиции упакованы отдельно.

10

Вариант 60 осуществления изобретения включает наборы, содержащие фармацевтические композиции в соответствии с любым из вариантов 1–17 осуществления изобретения, причем фармацевтические композиции упакованы вместе.

15

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Дизайн антител

Были получены биспецифические антитела, нацеленные на CD123 и CD3 человека или нацеленные на BCMA и CD3 человека, причем антитело к CD123 или антитело к BCMA и антитело к CD3 объединяли вместе после очистки посредством создания контролируемого обмена антигенсвязывающего плеча с использованием технологии Genmab (17, 18). В результате было получено моновалентное связывающее бифункциональное антитело DuoBody®, которое специфически связывается с клетками ОМЛ CD123+ человека или клетками ММ BCMA+ и CD3 Т-клетками (Фиг. 8А и 8Б).

Чтобы свести к минимуму эффекторные функции, опосредованные антителами, в Fc-домен были введены мутации для уменьшения взаимодействия с Fcγ-рецепторами. Биспецифические антитела (биспецифические BCMAxCD3 и биспецифические CD123xCD3), используемые в следующих экспериментах, содержат первую тяжелую цепь (HC1), вторую тяжелую цепь (HC2), первую легкую цепь (LC1) и вторую легкую цепь (LC2), причем пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD123 или BCMA, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3. Биспецифические антитела BCMAxCD3, используемые в следующих примерах, содержат HC1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, LC1,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и LC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Биспецифические антитела CD123xCD3, используемые в следующих примерах, содержат HC1, имеющий

5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LC2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Анализ цитотоксичности in vitro и ex vivo

10 Линии опухолевых клеток метили сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) и совместно культивировали с размороженными очищенными замороженными Т-клетками в присутствии или в отсутствие линий стромальных клеток (HS-5 и HS-27a), первичных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и эндотелиальных клеток CD105⁺. Через 24 часа в лунки добавляли

15 биспецифические антитела и инкубировали планшеты при температуре 37 °C с 5% CO₂ в течение 48 часов. Впоследствии клетки окрашивали на различные маркеры перед анализом на проточных цитометрах. Для транслучных экспериментов анализ проводили в 96-луночных планшетах с U-образным дном с транслучными вставками 0,4 мкм или без них (HTS TRANSWL96, Corning). Для экспериментов, связанных с

20 IncuCyte®, использовали красные флуоресцентные клетки OCI-AML5 (OCI-AML5-NucLight Red) и зеленые клетки HS-5 (HS-5-NucLight Green).

Для анализов *ex vivo* клетки HS-5 наносили перед добавлением моноклеарных клеток периферической крови ОМЛ (PBMC) или моноклеарных клеток костного мозга ММ (BMMC). Добавляли биспецифические антитела CD123 x CD3 или BCMA x

25 CD3 или ноль x CD3 (1 мкг/мл) с антителом к VLA4 или без него (5 мкг/мл). Через 72 часа истощение бластов CD123⁺ или плазмоцитов CD138⁺ ММ контролировали с помощью проточной цитометрии. Кроме того, оценивали размножение Т-клеток CD8, а также их статус активации (активация CD25).

Модель ксенотрансплантата MOLM-13 in vivo

30 PBMC человека (1 x 10⁷ клеток/мышь) инокулировали внутривенно (вв) за 6–7 дней до имплантации опухолевых клеток. В день исследования 0 мышам подкожно (п/к) имплантировали 1 x 10⁶ клеток MOLM-13 и две концентрации стромальных клеток костного мозга HS-5, 2 x 10⁵ и 5 x 10⁵. Лечение CD123 x CD3 (0,04 мг/кг и 0,008 мг/кг, n = 8) или контроль-несущую среду PBS (n = 5) вводили внутривенно (вв)

каждые три дня (q3d), по 5 доз. У отдельных мышей отслеживали потерю массы тела и ингибирование роста опухоли два раза в неделю на протяжении всего исследования. В случае исследования *in vivo* с блокирующим антителом VLA-4 лечение

биспецифическим антителом CD123 x CD3 (0,008 мг/кг, n = 8 или 9) или контроль-
 5 несущую среду PBS (n = 5) вводили внутривенно (вв), а антитела к VLA-4 (5 мг/кг) вводили внутривенно (вб). Ни одно животное не было исключено из анализа.

Статистические способы

Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 8 (SAS Institutes, г. Кэри, штат Северная Каролина, США). Для Фиг. 1 и 2
 10 применяли дисперсионный анализ Брауна — Форсайта и Уэлча, тогда как для Фиг. 3–7 применяли обычный двухфакторный дисперсионный анализ.

Клеточные линии

Клеточные линии KG1, H929, RPMI-8226, MM.1S, HS-5 и HS-27a были получены из Американской коллекции культур тканей (г. Манассас, штат Вирджиния,
 15 США). MOLM 13 и OCI-AML5 получали из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Германия). Первичные мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервированные, полученные от здоровых людей-доноров, были приобретены в Lonza (г. Базель, Швейцария), и эндотелиальные клетки костного мозга CD105⁺ были приобретены в All Cells (г. Аламида, штат Калифорния, США). IncuCyte® NucLight
 20 Green или NucLight Red Lentivirus Reagent (EF1a, Puro) был приобретен у Essen Bioscience (г. Анн-Арбор, штат Мичиган, США) и использовался в соответствии с инструкциями производителя для получения клеток HS-5-NucLight Green и OCI-AML5-NucLight Red. Обработку пурамицином использовали для отбора флуоресцентно-
 25 позитивных клеточных линий. Хотя клеточные линии не были недавно аутентифицированы, они дали отрицательный результат на заражение микоплазмой.

Анализ связывания с биспецифическими антителами

Все опухолевые клетки центрифугировали, дважды промывали фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) и добавляли 1×10^4 клеток в центр каждой лунки 96-луночного планшета с U-образным дном вместе с блоком кристаллизуемого
 30 фрагмента (Fc) (фрагмент IgG1 человека), который добавляли в концентрации 2 мг/мл, в течение 10 минут. В соответствующие лунки добавляли серийно разведенные биспецифические антитела. Планшеты инкубировали в темноте при температуре 37 °C 5% CO₂ в течение 4 часов. Впоследствии клетки промывали DPBS и определяли связывание биспецифического антитела посредством окрашивания мышинными

античеловеческими IgG4 (Southern Biotech, клон HP6025, № по каталогу 9200-09) и LIVE/DEAD (L/D; Invitrogen, № по каталогу L34976) в течение 30 минут. Наконец, клетки промывали, ресуспендировали в буфере для окрашивания и анализировали на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences). В Prism версии 7 (GraphPad) был построен график средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI). Ось X преобразовали в логарифмическую форму и применили нелинейную аппроксимацию кривой с учетом 4 параметров.

Анализ цитотоксичности in vitro с клеточными линиями

Линии опухолевых клеток (KG1, MOLM 13, OCI-AML5, H929, RPMI-8226 и MM.1S) подсчитывали и промывали DPBS перед инкубацией с CFSE (ресуспендированным в 150 мкл диметилсульфоксида и разбавленным 1:10 000) при 1×10^7 клеток/мл CFSE в течение 8 минут при комнатной температуре. Окрашивание гасили с помощью HI FBS. Клетки промывали в полной среде перед ресуспендированием в концентрации 2×10^5 клеток/мл в полной среде, содержащей 1 мг/мл фрагмента человеческого IgG1, впоследствии инкубировали в течение 15 минут. Очищенные замороженные Т-клетки (полученные от BioIVT (г. Уэстпорт, штат Нью-Йорк, США)) размораживали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Т-клетки выделяли из цельной крови с использованием градиента фикола (для выделения мононуклеарных клеток) и постинкубации при отрицательной селекции при комнатной температуре с коктейлем антител (CD16, CD19, CD36, CD56 и CD66b) для удаления «нежелательных» клеток. Клеточные линии стромы (HS-5 и HS-27a) собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали в концентрации 4×10^5 клеток/мл. В случае первичных мезенхимальных стромальных клеток (MCK) и эндотелиальных клеток CD105⁺ замороженные аликвоты, полученные из клеток Lonza и All соответственно, размораживали и ресуспендировали в концентрации 4×10^5 клеток/мл. Наконец, 50 мкл очищенных Т-клеток, 50 мкл стромальных клеток и 100 мкл меченых опухолевых клеток объединяли в каждой лунке 96-луночного планшета с U-образным дном с 0,5 мг/мл фрагмента IgG1 человека. Через 24 часа в лунки добавляли тестовые антитела. Антитела разбавляли до конечной исходной концентрации 133 нМ в DPBS или полной среде. Антитела дополнительно разбавляли в 3 раза и добавляли в соответствующие лунки. Все планшеты инкубировали при температуре 37 °C с 5% CO₂ в течение 48 часов после добавления антител. Впоследствии клетки промывали DPBS и окрашивали на различные маркеры перед анализом на проточных цитометрах.

Для экспериментов по пролиферации анализы *in vitro* выполняли, как подробно описано выше, за исключением того, что в данном случае Т-клетки были помечены красителем CFSE перед совместным культивированием, что позволило оценить пролиферацию посредством мониторинга CFSE через 96 часов после добавления биспецифических антител.

Для транслучных экспериментов анализ проводили в 96-луночных планшетах с U-образным дном с транслучными вставками 0,4 мкм или без них (HTS TRANSWL96, Corning). Стромальные клетки либо объединяли с Т- и опухолевыми клетками, либо отделяли от Т- и опухолевых клеток посевом на транслучную вставку.

Для экспериментов, связанных с IncuCyte®, использовали красные флуоресцентные клетки OCI-AML5 (OCI-AML5-NucLight Red) и зеленые клетки HS-5 (HS-5-NucLight Green). Для этих анализов опухолевые, стромальные и Т-клетки промывали и объединяли в среде RPMI без фенолового красного/10% HI FBS.

Изображения красных и зеленых объектов (обозначающие красный OCI-AML5 и зеленый HS-5) в каждой лунке регистрировали посредством IncuCyte® Zoom каждые 6 часов в течение 120 часов.

Для экспериментов по блокированию использовали следующие ингибиторы и нейтрализующие антитела: Ингибитор Bcl-2 (HA14-1), антитело к CXCR4 человека (12G5) и антитело к ITGA4/VLA4 человека (2B4) были приобретены в R&D systems (г. Миннеаполис, штат Миннесота, США).

Анализ цитотоксичности ex vivo с образцами пациента с первичным ОМЛ и ММ

30 000 или 600 000 клеток HS-5 высевали на лунку 6-луночного планшета в течение ночи. На следующее утро среду осторожно удаляли перед заменой на 3×10^6 первичных ОМЛ или ММ PBMC и BMMC соответственно в α MEM + 10% FBS с 0,5 мг/мл фрагмента IgG1 человека. Затем добавляли биспецифические антитела CD123 x CD3, BCMA x CD3 или ноль x CD3 (1 мкг/мл) с антителом к VLA4 или без него (5 мкг/мл). Через 72 часа истощение бластов CD123⁺ или плазмочитов CD138⁺ ММ контролировали с помощью проточной цитометрии. Кроме того, оценивали размножение Т-клеток CD8, а также их статус активации (активация CD25).

Проточная цитометрия и реагенты для определения антител

Антитела для цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) включали следующие антитела к антителу человека: CD278/ICOS (DX-29), CD4 (SK3), Гранзим В (GB11) (приобретен у BD Biosciences),

CD8 (RPA-T8), 41BB/CD137 (4B4-1), CD25 (BC96), перфорин (dG9), Tbet (4b10), PD-1/CD279 (EH12.2H7), TIM3 (F38-2E2), CD33 (WM53), CD38 (HIT2), CD123 (6H6), CD138 (MI15) (приобретены у BioLegend), LAG3 (3DS223H) (приобретен у eBiosciences) и LIVE/DEAD Near-IR (Life Technologies).

5 Для анализа FACS планшеты центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 5 минут. Впоследствии клетки промывали DPBS и окрашивали на маркеры активации Т-клеток и цитотоксичности в течение 30 минут. Наконец, клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания. Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали и увеличивали проницаемость их мембран с помощью набора для окрашивания IC (eBiosciences) в соответствии с инструкциями производителя с незначительными изменениями (перед инкубацией с внутриклеточным цитокиновым антителом четыре раза промывали буфером для увеличения проницаемости мембран).

15 Данные были получены на FACSCanto II (BD Biosciences) или LSRFortessa ((BD Biosciences). Гибель опухолевых клеток оценивали посредством гейтирования по прямому рассеянию (FSC) и боковому рассеянию (SSC) для определения клеточных популяций, впоследствии по CFSE⁺ опухолевым процессам и, наконец, по LIVE/DEAD в ближнем ИК-диапазоне для оценки цитотоксичности опухолевых клеток. После сравнения с обработанными PBS и изотипическими контролями очерчивали гейт L/D⁺. Эти контроли также помогают учитывать ошибки, связанные с неспецифическим связыванием антител или побочными эффектами. Активацию Т-клеток оценивали посредством гейтирования по FSC и SSC для идентификации клеточных популяций, событий CFSE, живых клеток, а впоследствии искали положительное окрашивание для нескольких маркеров. Процент мертвых опухолевых клеток был наносили на график с помощью Prism 8 и анализировали путем аппроксимации кривой нелинейной регрессии с учетом 4 параметров. Для маркеров активации Т-клеток среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции различных маркеров анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo и отображали в виде графика с помощью Prism 8.

Иммуноблоттинг и реагенты для определения антител

30 Автоматический вестерн-блоттинг выполняли с помощью автоматизированной системы Wes (ProteinSimple, штат Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы смешивали с пятикратным буфером для разведения образцов, содержащим ДСН, ДТТ и флуоресцентные стандарты молекулярной массы, и нагревали при температуре 95 °C в течение 5 минут, а затем выгружали на планшет,

предварительно заполненный матриксами для штабелирования и разделения, вместе с блокирующим и промывочным буферами, растворами антител и реагентами для обнаружения. Для анализа использовали настройки по умолчанию. Для обнаружения белков использовали следующие антитела к антителам человека, приобретенные у Cell Signaling Technology (г. Данверс, штат Массачусетс, США): Bcl-2 (№ 2872), фосфо-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® mAb кролика (№ 4511), фосфо-Akt (Ser473) (D9E) XP® mAb кролика (№ 4060) и β -актин (D6A8) mAb кролика (№ 8457).

Животные

Использовали самок мышей NSG (NOD scid gamma или NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (The Jackson Laboratory, г. Бар-Харбор, штат Мэн, США) в возрасте приблизительно 6–8 недель и с весом 20 г. Всем животным давали возможность акклиматизироваться и восстановиться после стресса, связанного с транспортировкой, в течение по меньшей мере 5 дней до использования в эксперименте. В свободном доступе предоставляли хлорированную воду, очищенную обратным осмосом (ОО), и обработанный облучением корм (Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010, Lab Diet), и животных содержали в 12-часовом цикле свет/темнота. Клетки, подстилку и бутылки для воды автоклавировали перед применением и меняли еженедельно. Все эксперименты были выполнены в соответствии с руководством по уходу и применению лабораторных животных и утверждены Институциональным комитетом по уходу и применению животных компании Janssen R&D, г. Спринг-Хаус, штат Пенсильвания, США.

Результаты

Стромальные клетки КМ защищают клеточные линии ОМЛ и ММ от

биспецифических антител к CD3 и цитотоксичности, опосредованной Т-клетками

Ниша КМ отличается своей защитной и иммуносупрессивной средой. Стромальные клетки КМ использовали для имитации ниши КМ, поскольку они являются основным клеточным компонентом внутрикостных и сосудистых ниш, которые управляют фундаментальными решениями судьбы гемопоэтических стволовых клеток (HSC), включая самообновление, выживание, дифференцировку и пролиферацию (19, 20). Кроме того, задокументировано, что стромальные клетки КМ опосредуют иммуносупрессию (13, 21), а также активируют множественные пути выживания и антиапоптозные пути в опухолевых клетках, что позволяет им сопротивляться терапии различных типов (22). Клеточные линии ОМЛ или ММ

совместно культивировали с Т-клетками и биспецифическими антителами в отсутствие или в присутствии стромальных клеток КМ. Использовали биспецифические антитела, нацеленные либо на CD123, либо на BCMA и CD3 (инструментальные антитела).

Данные о связывании, уничтожении и активации Т-клеток, демонстрирующие

- 5 эффективность этих антител, представлены на Фиг. 8. При использовании биспецифического антитела CD123 x CD3 наблюдалось дозозависимое уничтожение CD123-экспрессирующей лейкозной клеточной линии KG-1 (Фиг. 1А и 1Б). Такого уничтожения не наблюдалось в присутствии биспецифических антител, которые экспрессируют либо CD3, либо CD123 вместе с ненацеленным (нулевым) плечом
- 10 (Фиг. 1А и 1Б). Аналогичные результаты наблюдали при использовании линии H929, экспрессирующей BCMA, и другого биспецифического антитела BCMA x CD3 (Фиг. 1В–1Г), где специфическое уничтожение было опосредовано BCMA x CD3 в отличие от нулевых контролей. При добавлении в совместную культуру стромальных клеток наблюдалось статистически значимое снижение максимальной наблюдаемой
- 15 цитотоксической реакции даже при высоких концентрациях биспецифических антител (Фиг. 1А–1Г). Кроме того, значения EC50 биспецифического антитела были в 3–5 раз выше в присутствии стромы (Фиг. 9А). Стромальное ингибирование активности биспецифических антител не ограничивалось только линиями стромальных клеток фибробластов (HS-5 и HS-27a), но также наблюдалось с первичными мезенхимальными
- 20 стромальными клетками (МСК), полученными из костного мозга здоровых доноров (Фиг. 1А–1Г). Ингибирование активности биспецифических антител зависело от количества стромальных клеток, присутствующих в совместной культуре; при этом снижение эффективности все еще наблюдалось, когда стромальных клеток было в 10 раз меньше, чем раковых клеток в совместных культурах (Фиг. 9Б). Интересно, что при
- 25 добавлении эндотелиальных клеток CD105⁺, полученных из мононуклеарных клеток костного мозга здоровых доноров, ингибирования не наблюдалось (Фиг. 1А–1Г). Этот результат продемонстрировал, что не все стромальные клетки отрицательно влияли на эффективность биспецифических антител, перенаправляющих CD3, а также объяснял тот факт, что простое присутствие другого типа клеток в совместной культуре
- 30 опухолевых Т-клеток не способствовало эффекту ингибирования. Опосредованное стромой ингибирование активности биспецифических антител не было уникальным для Т-клеток от одного донора, но наблюдалось для Т-клеток от множества доноров (средние значения и медианы для разных доноров представлены на Фиг. 1А, В и 1Б, Г соответственно). Эти данные не были специфичными для одной клеточной линии ОМЛ

или ММ, поскольку аналогичные результаты наблюдались с другими клеточными линиями ОМЛ CD123⁺ (MOLM-13 и OCI-AML5) и ММ ВСМА⁺ (RPMI-8226 и MM.1S) (Фиг. 9В и 9Г). Эти данные впервые демонстрируют, что стромальные клетки влияют на эффективность и действенность биспецифических антител, перенаправляющих CD3.

5 *Стромальные клетки КМ подавляют активность Т-клеток и активируют выживаемость и антиапоптозные пути в раковых клетках*

Затем исследовали механизмы, лежащие в основе стромального ингибирования активности биспецифических антител. Для этого фенотип Т-клеток оценивали в анализах цитотоксичности совместной культуры Т-клеток и опухолевых клеток в
10 отсутствие или в присутствии стромальных клеток. Лечение биспецифическим антителом CD123 x CD3 в отсутствие стромы приводило к усилению маркеров активации, включая CD25, CD137 и ICOS, с сопутствующим увеличением маркеров контрольных точек, включая PD1, LAG3 и TIM3, в CD8⁺ Т-клетках (Фиг. 2А). Кроме того, CD8⁺ Т-клетки проявляли характеристики цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)
15 за счет повышенной продукции эффекторных белков, таких как перфорин и гранзим В, и усиления экспрессии T-bet (Фиг. 2А). Однако, когда стромальные клетки присутствовали в совместной культуре, Т-клетки были менее активированы со сниженной экспрессией маркеров активации, эффекторных маркеров и маркеров контрольной точки (Фиг. 2А). Эти результаты наблюдали со множеством доноров Т-
20 клеток (средние значения для разных доноров представлены на Фиг. 2А), а также с клеточной линией ММ Н929 и биспецифическим антителом ВСМАхCD3 (Фиг. 10А). Результаты со сниженной экспрессией маркеров контрольных точек на Т-клетках в присутствии стромы могут сначала показаться нелогичными, учитывая, что PD1, TIM3 и LAG3 распознаются как ингибирующие белки, которые регулируют реакцию
25 активации Т-клеток. Однако эти белки индуцируются только при активации Т-клеток и отсутствуют в наивных Т-клетках (23–29). Таким образом, с учетом этих данных неудивительно, что апрегуляция PD1, TIM3 и LAG3 снижается на Т-клетках в присутствии стромальных клеток и поддерживает менее активированный фенотип Т-клеток в присутствии ингибирующего стромального компартмента. Кроме того,
30 пролиферация Т-клеток снижалась в присутствии стромы после обработки обоими биспецифическими антителами (Фиг. 10Б).

В дополнение к иммуносупрессии было исследовано, может ли опосредованная стромой активация множественных путей выживания и антиапоптозных путей в лейкозных и миеломных опухолевых клетках быть дополнительным механизмом,

опосредующим резистентность к терапии (30). Наблюдались повышенное фосфорилирование фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и Akt и повышенная экспрессия белка Bcl-2 в клетках KG-1, которые культивировали со стромальными клетками HS-5, а не только в клетках KG-1 или HS-5 (Фиг. 2Б). Вместе эти данные свидетельствуют о том, что опухолевые клетки ОМЛ и ММ могут уклоняться от опосредованной Т-клетками смерти за счет механизма, зависящего от стромальных клеток, включающего активацию путей резистентности в опухолевых клетках в дополнение к подавлению активации Т-клеток.

Затем исследовали относительный вклад Т-клеточной иммуносупрессии и апрегуляции путей выживания в фенотип сниженной эффективности перенаправления CD3. Учитывая, что Bcl-2 непосредственно участвует в выживании и резистентности клеток ОМЛ и ММ при нескольких видах терапии (30, 31), анализы цитотоксичности проводили в присутствии стромы с добавлением или без добавления ингибитора Bcl-2 НА14-1. Хотя ингибитор успешно предотвращал экспрессию Bcl-2 (Фиг. 11), он не восстанавливал опосредованное стромой ингибирование перенаправления CD3 (Фиг. 2В), и Т-клетки оставались менее активированными (Фиг. 2Г). Эти данные подтверждают ранее опубликованные результаты, в которых сверхэкспрессия Bcl-2 в клетках-мишенях имела минимальное влияние на активность AMG110 (EрCAMxCD3 BiTE) (32).

Стромальные клетки костного мозга ослабляют эффективность перенаправления CD3 *in vivo*

Затем исследовали *in vivo*, могут ли стромальные клетки защищать опухолевые клетки от опосредованной биспецифическими антителами и Т-клетками цитотоксичности. С этой целью PBMC человека внутривенно инокулировали самкам мышей NSG, а через неделю MOLM-13 со стромальными клетками костного мозга HS-5 или без них имплантировали подкожно (пк) в бок мышей. Впоследствии мыши получали лечение CD123 x CD3 (8 мкг/кг), начиная с 5-го дня после имплантации опухолевых клеток, дважды в неделю, всего 5 процедур. Лечение (п/к) CD123 x CD3 позволяло существенно ингибировать рост опухоли (ингибирование роста опухоли (TGI, день 25) = 78%, $p < 0,0001$) в группе, получавшей только MOLM-13, по сравнению с PBS или CD3 x нулевой контроль (Фиг. 3А). Эта противоопухолевая активность была заметно снижена (TGI, день 25 = 15%) в присутствии стромы и была статистически значимой по сравнению с группой, получавшей только биспецифическое антитело MOLM-13 ($p < 0,0001$) (Фиг. 3А). Кроме того, несмотря на то, что

наблюдалась одинаковая инфильтрация CD8⁺ Т-клеток в опухоли со стромой или без нее (Фиг. 3Б), были различия в профилях активации Т-клеток, которые коррелировали с наличием стромы (Фиг. 3В). CD8⁺ Т-клетки у групп MOLM-13+HS-5, получавших биспецифические антитела, демонстрировали нарушенную активацию CD25, PD1 и гранзима В по сравнению с контрольными группами MOLM-13 (Фиг. 3В). Эти результаты подтверждают наблюдения *in vitro* и ясно указывают на то, что стромальные клетки костного мозга снижают эффективность других сильнодействующих терапевтических средств, направленных на перенаправление CD3, посредством подавления активации Т-клеток.

10 *Адгезия к строме имеет решающее значение для опосредования иммуносупрессии и выживания раковых клеток*

Стромальные клетки могут опосредовать иммуносупрессию и защищать опухолевые клетки от цитотоксичности посредством секреции растворимых факторов, включая иммуносупрессивные медиаторы, такие как IL-10, TGF-β и PGE2, или факторы роста, такие как, среди прочих, фактор стволовых клеток (SCF), IL-7, IL-15, CXCL-12 (21, 33). Кроме того, стромальные клетки могут напрямую взаимодействовать с опухолевыми клетками через пути адгезии, индуцирующие резистентность (34), и таким образом защищать злокачественные клетки от цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, в зависимости от межклеточного контакта. Визуальное исследование анализов цитотоксичности показало, что остаточные лейкозные клетки, не уничтоженные цитотоксичностью, опосредованной биспецифическими антителами и Т-клетками, плотно сгруппированы вокруг стромальных клеток (Фиг. 4А), что свидетельствует о том, что пути межклеточных контактов могут играть важную роль в стромально-опосредованной защите раковых клеток. Чтобы различать механизмы, зависящие от растворимых и межклеточных контактов, были проведены транслучные анализы *in vitro*, чтобы оценить, могут ли стромальные клетки по-прежнему ингибировать эффективность лизиса, опосредованного биспецифическими антителами и Т-клетками, даже если они отделены от опухоли и Т-клеток. Было замечено, что межклеточный контакт играет доминирующую роль в опосредовании стромальной защиты клеточных линий ОМЛ и ММ от цитотоксичности, перенаправленной биспецифическими антителами и Т-клетками, поскольку стромальные клетки не проявляли никакого ингибирующего действия при отделении от опухолевых клеток (Фиг. 4Б и Фиг. 12А). Аналогичные тенденции наблюдались в отношении Т-клеток от разных доноров (2 разных донора Т-клеток, см. Фиг. 4Б). Более

того, когда стромальные клетки помещали в транслучную вставку, они не могли подавлять активацию Т-клеток и экспрессию перфорины, гранзима В и Т-bet (Фиг. 4В). Эти данные демонстрируют сильную зависимость от межклеточных взаимодействий для стромально-опосредованного подавления Т-клеток и защиты от Т-клеточно-зависимой цитотоксичности.

Блокирование VLA4 in vitro и in vivo приводит к уменьшению опосредованного стромой ингибирования перенаправления CD3

Исследовали пути адгезии, чтобы определить, какой из них был критическим для стромального ингибирования эффективности биспецифического антитела. В центре внимания были CXCR4 и VLA-4 из-за их документально подтвержденной роли в опосредовании взаимодействий ОМЛ/ММ со стромой в КМ (34). При использовании блокирующих антител VLA-4 или CXCR4 (приобретены у R&D Systems) было замечено, что в отличие от ингибирования CXCR4, которое не способствовало восстановлению опосредованных биспецифическими антителами цитотоксических ответов в присутствии стромы, ингибирование VLA-4 позволяло восстановить (50–60%) опосредованную стромой защиту KG-1 и MOLM-13 от цитотоксичности биспецифического антитела и Т-клеток CD123 x CD3 (Фиг. 5А и Фиг. 12Б). Этот эффект был более выражен с биспецифическим антителом H929 и BCMA x CD3, где ингибирование VLA-4 позволяло восстановить цитотоксические ответы (80–100%) даже в присутствии стромы (Фиг. 5Б). Повышение цитотоксического ответа при ингибировании VLA-4 коррелировало с восстановленной экспрессией маркеров активации Т-клеток, таких как гранзим В и CD25, которые все еще были подавлены при блокировании CXCR4 (Фиг. 5В и 5Г). Это увеличение маркеров активации Т-клеток с ингибированием VLA-4 также было статистически значимым по сравнению с необработанными аналогами (совместные культуры, содержащие либо HS-5, либо первичные стромальные клетки МСК). Ингибирование VLA-4 также приводило к ослаблению фосфорилирования путей Akt и PI3K (Фиг. 13).

Предыдущие результаты *in vivo* показали, что эффективность CD123 x CD3 была ослаблена при лечении опухолей MOLM-13 стромальными клетками костного мозга HS-5. Чтобы определить, можно ли восстановить противоопухолевый эффект, нейтрализующее антитело к VLA-4 комбинировали с CD123 x CD3 для лечения мышей, являющихся носителями MOLM-13. Как и в предыдущих наблюдениях CD123 x CD3 (8 мкг/кг) способствовали повышению TGI на 24-й день до 52,3% ($p \leq 0,0001$) по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS, в то время как та же доза

биспецифического антитела оказывала минимальное воздействие на опухоли MOLM-13, совместно инъецированные клетками HS-5 (TGI, день 23 = 7,6%) (Фиг. 6А). Однако одновременное добавление антител к VLA-4 с CD123 x CD3 приводило к увеличению TGI на 23-й день опухолей MOLM-13 с клетками HS-5 на 48,4% ($p = 0,0001$) (Фиг. 6А).

- 5 Увеличение TGI опухолей MOLM-13 со стромой, получающей блокаду VLA-4 и лечение биспецифическими антителами, сопровождалось улучшенной активацией CD8⁺ Т-клеток и эффекторными ответами, включая экспрессию перфорины, CD25 и PD1 (Фиг. 6Б). Повышенный TGI и усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ наблюдали у мышей с опухолью +HS-5, получавших комбинацию блокады VLA-4 и лечения
- 10 биспецифическими антителами, и этот эффект отсутствовал, когда мышам вводили дозу любого агента по отдельности. Эти результаты ясно указывают на то, что сопутствующая блокада VLA-4 вместе с агентами перенаправления CD3 может преодолевать супрессивные эффекты, опосредованные стромальными клетками, и может опосредовать превосходные противоопухолевые ответы.

- 15 *Блокирование VLA-4 первичных культур пациента ex vivo способствует восстановлению эффективности перенаправления CD3, несмотря на присутствие стромы*

- Полученные данные впоследствии были подтверждены первичными замороженными/размороженными образцами ОМЛ и ММ. Учитывая, что первичные
- 20 опухолевые клетки может быть проблематично поддерживать в культуре без экзогенного добавления цитокинов или стромальной поддержки, авторы изобретения выполняли *ex vivo* культивирование образцов ОМЛ/ММ с различным количеством стромальных клеток (репрезентативная стратегия гейтирования показана на Фиг. 14 и 15). Неожиданно было обнаружено заметное и селективное уничтожение бластов ОМЛ
- 25 CD123⁺ CD33⁺, а также опухолевых клеток ММ BCMA⁺ CD138⁺ в культурах, обработанных биспецифическими антителами CD123 x CD3 и BCMA x CD3 с низким соотношением строма : опухоль (0,01x HS-5), а не тогда, когда культуры обрабатывали нулевыми контролями (Фиг. 7А и 7В). Эффект уничтожения CD123 x CD3 был минимальным в культурах с высоким соотношением строма : опухоль (0,2x HS-5,
- 30 Фиг. 7А и 7В). Кроме того, за эффективными цитотоксическими ответами очищения первичных опухолевых клеток следовала экспансия или активация CD8⁺ Т-клеток, которые были ограничены культурами, обработанными биспецифическими антителами, с меньшим содержанием стромы (Фиг. 7Б и 7Г). Наконец, при использовании нейтрализованного VLA-4 в комбинации с CD123 x CD3 или BCMA x

CD3 наблюдалось превосходное уничтожение опухолевых клеток и восстановление эффективности биспецифического антитела, несмотря на более высокое содержание стромы в культурах (Фиг. 7А–Г). Блокирование VLA-4 вместе с лечением биспецифическими антителами также способствовала восстановлению

5 экспансии/активации CD8⁺ Т-клеток в культурах с более высоким содержанием стромы (Фиг. 7Б и 7В). Эти результаты наблюдались у 3 разных пациентов (пациенты с ОМЛ на Фиг. 7А–Б и пациенты с ММ на Фиг. 7В–Г) и подтверждают предыдущие результаты *in vitro* и *in vivo*. Ингибирование VLA-4 само по себе приводило к повышенному истощению бластов CD123⁺ в культурах с высоким соотношением
10 строма : опухоль в одном из образцов пациентов с ОМЛ, но этот эффект широко не наблюдался (данные не показаны). Эти данные действительно демонстрируют, что комбинирование блокады VLA-4 с терапевтическими средствами с биспецифическими антителами для перенаправления CD3 позволяет преодолеть супрессивные эффекты стромальных клеток и обеспечить обоснование для изучения таких комбинаций в
15 клинических условиях.

Обсуждение

Сложность ниши КМ была действительно оценена в последние годы благодаря значительным достижениям в понимании молекулярных и клеточных факторов, которые способствуют поддержанию и регуляции гемопоэтических стволовых клеток.
20 В контексте гематологических злокачественных опухолей те же факторы могут быть использованы раковыми стволовыми клетками для защиты от нескольких противораковых терапий и резистентности к ним, что способствует минимальной остаточной болезни.

Результаты, представленные в настоящем документе, впервые показывают, как
25 компоненты микроокружения КМ могут препятствовать эффективному в других отношениях лечению Т-клетками. В частности, было замечено, что в присутствии стромальных клеток КМ раковые клетки ОМЛ и ММ были защищены от цитотоксичности, опосредованной Т-клетками и биспецифическими антителами. Уменьшение гибели раковых клеток соотносится с притуплением активации Т-клеток и
30 эффекторных ответов. Блокирование межклеточных взаимодействий, особенно тех, которые опосредованы посредством VLA-4, обратило вспять подавление иммунитета Т-клеток, что привело к усилению уничтожения раковых клеток ОМЛ и ММ. Таким образом, результаты подтверждают, что микроокружение КМ является значимым фактором, который необходимо учитывать даже в контексте сильнодействующей и

эффективной иммунотерапии, такой как перенаправление CD3. Результаты также обеспечивают обоснование и доказательства для комбинирования агентов, препятствующих адгезии, с терапевтическими средствами для перенаправления CD3, для лучшего и более полного устранения МОБ.

- 5 Хотя показано, что блокирование VLA-4 обращает вспять стромальное ингибирование эффективности опосредованной биспецифическими Т-клетками цитотоксичности и иммуносупрессии, механизмы, лежащие в основе этой регуляции, еще предстоит определить. VLA-4 экспрессируется на Т-клетках и может давать ко-стимулирующие сигналы, приводящие к активации Т-лимфоцитов в дополнение к опосредованию адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов (35–38). Клинические исследования натализумаба, гуманизированного моноклонального антитела IgG4, блокирующего VLA-4, у пациентов с рассеянным склерозом, одобренного для лечения рассеянного склероза, показали, что препарат не только увеличивает количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в периферической крови (39), но также стимулирует CD4⁺ и CD8⁺ и Т-клетки производить больше IL-2, TNF-α, IFN-γ и IL-17 (40–43). Хотя результаты были более скромными, аналогичные результаты наблюдались *in vitro*, когда натализумаб индуцировал умеренную активацию экспрессии IL-2, IFN-γ и IL-17 в активированных первичных CD4⁺ Т-клетках человека, полученных от здоровых доноров и размноженных *ex vivo*, что позволяет предположить, что натализумаб непосредственно действует на Т-клетки (42). Вышеупомянутое исследование было сосредоточено на CD4⁺ Т-клетках; так что, наблюдается ли тот же эффект в отношении CD8⁺ Т-клеток *in vitro*, еще предстоит выяснить. Другим механизмом, объясняющим эффект блокады VLA-4, может быть то, что блокирование взаимодействия между опухолевыми и стромальными клетками нарушает скопление опухолевых клеток вокруг стромы, что позволяет Т-клеткам получить доступ к опухолевым клеткам, чем обусловлена большая эффективность перенаправления CD3. Наконец, было показано, что ингибирование VLA-4 непосредственно действует на клетки ОМЛ и ММ, делая их более восприимчивыми к химиотерапии и таргетной терапии, предотвращая экспрессию и повышая регуляцию ключевых путей выживания в самих опухолевых клетках (34) или продукцию противовоспалительных цитокинов опухолевыми клетками.

Хотя это исследование было сосредоточено на микроокружении КМ, вполне возможно, что подобное явление происходит и в солидных опухолях. Сольные опухоли содержат сложную плотную сеть молекул внеклеточного матрикса, а также

различные типы стромальных клеток, которые могут оказывать иммуносупрессивное действие.

Результаты указывают на важность нацеливания на микроокружение КМ в сочетании с терапией, на основе перенаправления CD3. Кроме того, результаты показывают, что VLA-4 потенциально можно использовать в качестве биомаркера для прогнозирования реакции на перенаправление CD3 и, возможно, использовать для выбора пациентов для этой иммунотерапии.

Справочная литература

Каждая из процитированных в настоящем документе публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

1. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. Hematology American Society of Hematology Education Program. 2012;2012:35–42.

2. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. Blood. 2009;114(15):3139–46.

3. El Rassi F, Arellano M. Update on optimal management of acute myeloid leukemia. Clinical Medicine Insights Oncology. 2013;7:181–97.

4. Martinez-Lopez J et al. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. Blood. 2011;118(3):529–34.

5. Malard F, Harousseau JL, Mohty M. Multiple myeloma treatment at relapse after autologous stem cell transplantation: A practical analysis. Cancer treatment reviews. 2017;52:41-7.

6. Blatter S, Rottenberg S. Minimal residual disease in cancer therapy--Small things make all the difference. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2015;21-22:1–10.

7. Basak GW, Srivastava AS, Malhotra R, Carrier E. Multiple myeloma bone marrow niche. Current pharmaceutical biotechnology. 2009;10(3):345-6.

8. Sanchez-Aguilera A, Mendez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2016.

9. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. Blood. 2009;114(6):1150-7.

10. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. Nature reviews Immunology. 2011;12(1):49-60.

11. Noborio-Hatano K et al. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 2009;28(2):231-42.
12. Green AS et al. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Science advances*. 2015;1(8):e1500221.
13. Krause DS, Scadden DT. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(11):1376–87.
14. Pallasch CP et al. Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *Cell*. 2014;156(3):590–602.
15. Zhukovsky EA, Morse RJ, Maus MV. Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Current opinion in immunology*. 2016;40:24–35.
16. Topp MS et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(36):4134–40.
17. Labrijn AF et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(13):5145–50.
18. Labrijn AF et al. Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. *Nat Protoc*. 2014;9(10):2450–63.
19. Rashidi A, Uy GL. Targeting the microenvironment in acute myeloid leukemia. *Current hematologic malignancy reports*. 2015;10(2):126–31.
20. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 2008;22(5):941–50.
21. Tripodo C et al. The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):456–66.
22. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(9):2519–26.
23. Chikuma S et al. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J Immunol*. 2009;182(11):6682–9.
24. Inozume T et al. Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *J Immunother*. 2010;33(9):956–64.

25. Gros A et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest.* 2014;124(5):2246–59.
26. Simon S et al. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. *Oncoimmunology.* 2016;5(1):e1104448.
- 5 27. Gros A et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med.* 2016;22(4):433–8.
28. Huard B, Gaulard P, Faure F, Hercend T, Triebel F. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics.* 1994;39(3):213–7.
- 10 29. Hastings WD et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4⁺ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.* 2009;39(9):2492–501.
30. Matsunaga T et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med.* 2003;9(9):1158–65.
- 15 31. Maji S et al. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2018;137:37–75.
32. Deisting W, Raum T, Kufer P, Baeuerle PA, Munz M. Impact of Diverse Immune Evasion Mechanisms of Cancer Cells on T Cells Engaged by EpCAM/CD3-Bispecific Antibody Construct AMG 110. *PloS one.* 2015;10(10):e0141669.
- 20 33. Raffaghello L, Vacca A, Pistoia V, Ribatti D. Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. *Oncotarget.* 2015;6(5):2589–603.
34. Rashidi A, DiPersio JF. Targeting the leukemia-stroma interaction in acute myeloid leukemia: rationale and latest evidence. *Therapeutic advances in hematology.* 2016;7(1):40–51.
- 25 35. Sato T, Tachibana K, Nojima Y, D'Avirro N, Morimoto C. Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *Journal of immunology.* 1995;155(6):2938–47.
36. Davis LS, Oppenheimer-Marks N, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Lipsky PE. Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules. *Journal of immunology.* 1990;145(3):785–93.
- 30 37. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4⁺ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *Journal of immunology.* 1990;145(1):59–67.

38. Mittelbrunn M et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(30):11058–63.
- 5 39. Marousi S, Karkanis I, Kalamatas T, Travasarou M, Paterakis G, Karageorgiou CE. Immune cells after prolonged Natalizumab therapy: implications for effectiveness and safety. *Acta neurologica Scandinavica*. 2013;128(1):e1-5.
40. Bornsen L et al. Effect of natalizumab on circulating CD4+ T-cells in multiple sclerosis. *PloS one*. 2012;7(11):e47578.
- 10 41. Kivisakk P et al. Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology*. 2009;72(22):1922–30.
42. Benkert TF et al. Natalizumab exerts direct signaling capacity and supports a pro-inflammatory phenotype in some patients with multiple sclerosis. *PloS one*. 2012;7(12):e52208.
- 15 43. Kimura K et al. Disrupted balance of T cells under natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(2):e210.
44. Yu S et al. Recent advances of bispecific antibodies in solid tumors. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):155.
45. Ishiguro T et al. An anti-glypican 3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody
20 for treatment of solid tumors. *Science translational medicine*. 2017;9(410).
46. Feig C et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(50):20212-7.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

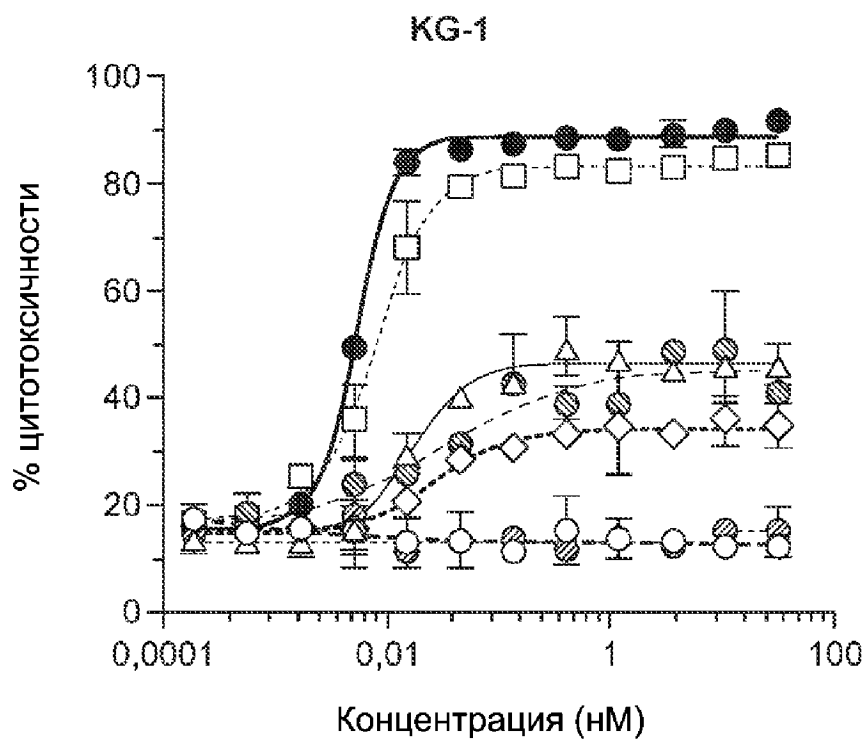
1. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4, причем
 5 терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки содержит первую связывающую область, которая иммуноспецифически связывается с поверхностным антигеном Т-клетки, и вторую связывающую область, которая иммуноспецифически связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА).
- 10 2. Фармацевтическая композиция по п. 1, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, в которой терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой антитело или его
 15 антигенсвязывающий фрагмент.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–3, в которой поверхностный антиген Т-клеток выбран из группы, состоящей из CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, CD40L, CD44, CD137, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186,
 20 BTNL8, PD-1, CD195 и NKG2C.
5. Фармацевтическая композиция по п. 4, в которой поверхностный антиген Т-клетки представляет собой CD3.
- 25 6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–5, в которой ТАА выбран из группы, состоящей из BCMA, CD123, GPRC5D, CD33, CD19, PSMA, TMEFF2, CD20, CD22, CD25, CD52, ROR1, HM1.24, CD38 и SLAMF7.
7. Фармацевтическая композиция по п. 6, в которой терапевтическое средство для
 30 перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело BCMAxCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с BCMA, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой биспецифическое антитело ВСМАхCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.
9. Фармацевтическая композиция по п. 8, в которой HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
10. Фармацевтическая композиция по п. 8, в которой HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
11. Фармацевтическая композиция по п. 6, в которой терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки представляет собой биспецифическое антитело CD123хCD3, имеющее первый антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD123, и второй антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD3.
12. Фармацевтическая композиция по п. 11, в которой биспецифическое антитело CD123хCD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), и при этом пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, а пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт.
13. Фармацевтическая композиция по п. 12, в которой HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HC2 содержит аминокислотную

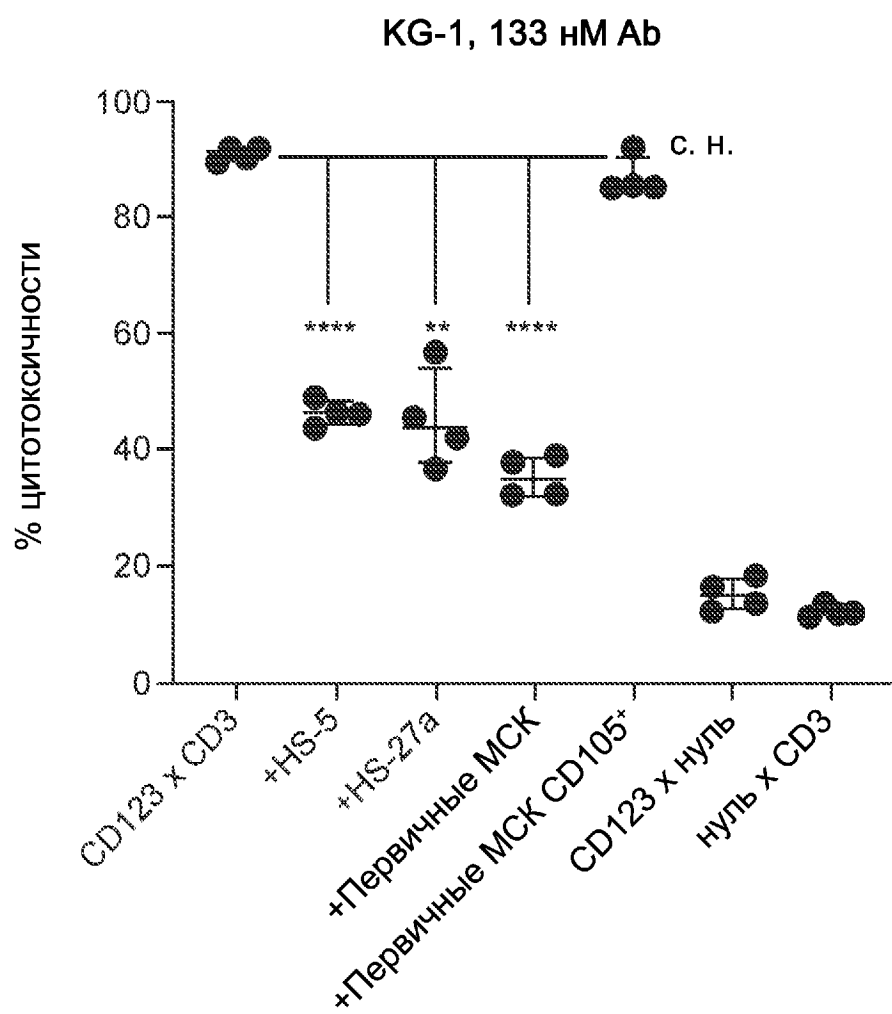
последовательность SEQ ID NO: 9 и LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

- 5 14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–13, в которой ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 10 15. Фармацевтическая композиция по п. 14, в которой антитело к VLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклональных антител, фрагментов scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ и F(v), мономеров и димеров тяжелой цепи, мономеров и димеров легкой цепи и димеров, состоящих из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи.
- 15 16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–13, в которой ингибитор пути адгезии VLA-4 представляет собой антагонист VLA-4.
- 20 17. Фармацевтическая композиция по п. 16, в которой антагонист VLA-4 выбран из группы, состоящей из BIO1211, TCS2314, BIO5192 и TR14035.
- 25 18. Способ уничтожения раковых клеток, включающий разрыв межклеточного контакта между раковыми клетками и стромальными клетками, включая оказание воздействия на раковые клетки терапевтически эффективным количеством фармацевтической композиции по любому из пп. 1–17.
- 30 19. Способ по любому из пп. 18, в котором рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.
20. Способ по п. 18 или 19, в котором терапевтическое средство для перенаправления Т-клетки и ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят одновременно или последовательно.
21. Способ по п. 20, в котором ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят до терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.

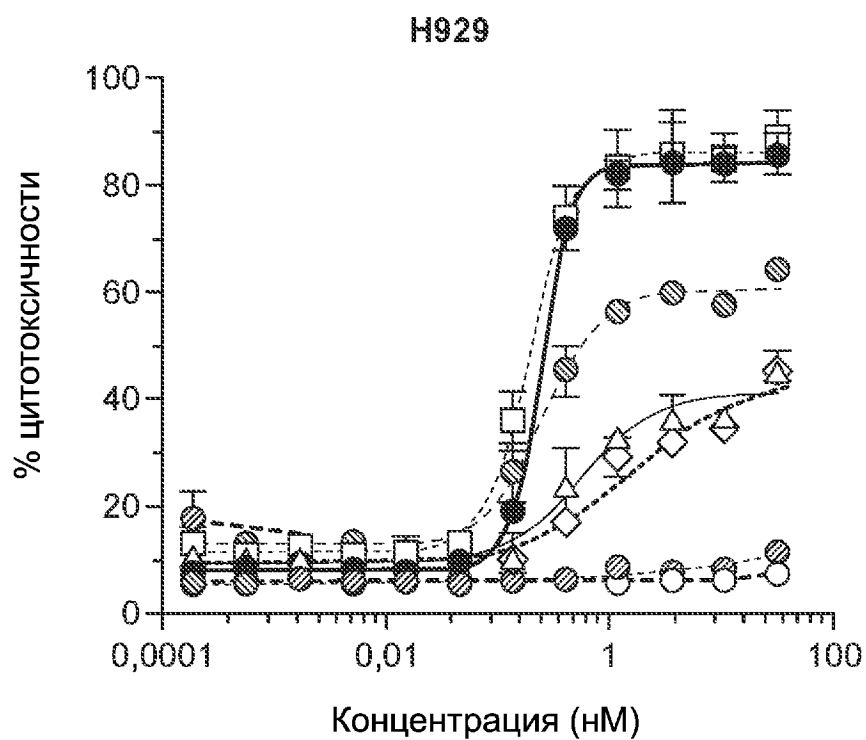
22. Способ по п. 20, в котором ингибитор пути адгезии VLA-4 вводят после введения терапевтического средства для перенаправления Т-клетки.
23. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1–17.

ФИГ. 1А

- CD123 x CD3
- CD123 x нуль
- ...●... нуль x CD3
- △— +HS-5
- +HS-27a
- ◇- +Первичные МСК
- +Первичные МСК CD105⁺

ФИГ. 1Б

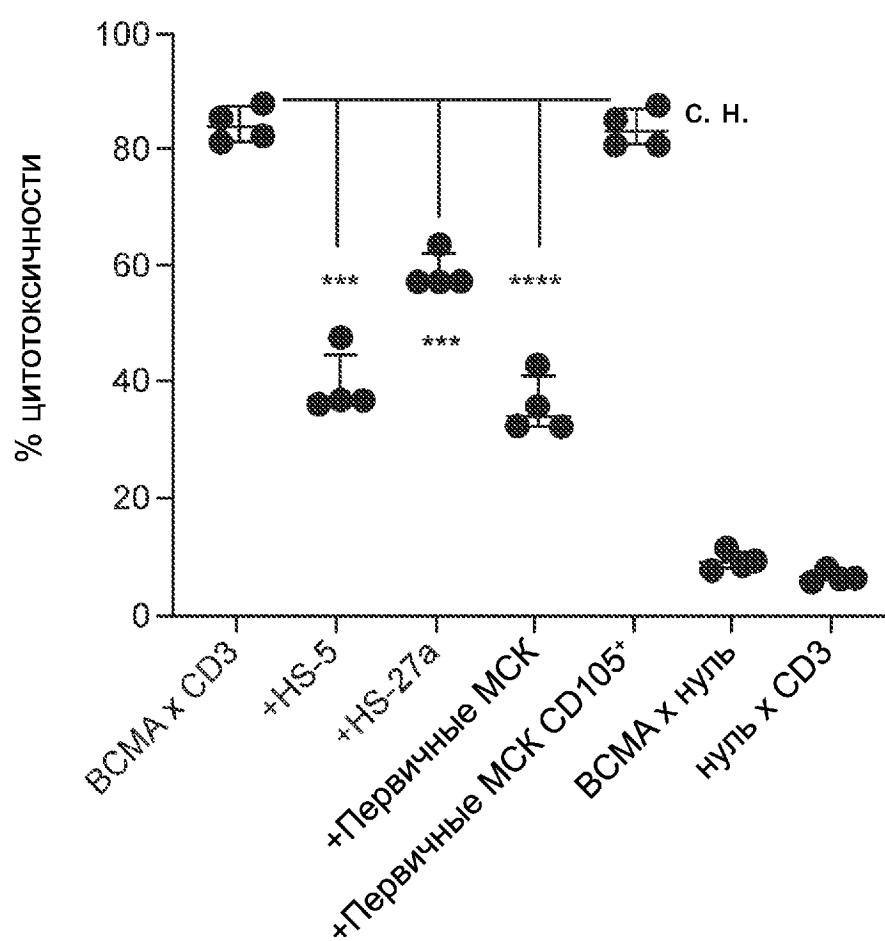
ФИГ. 1В



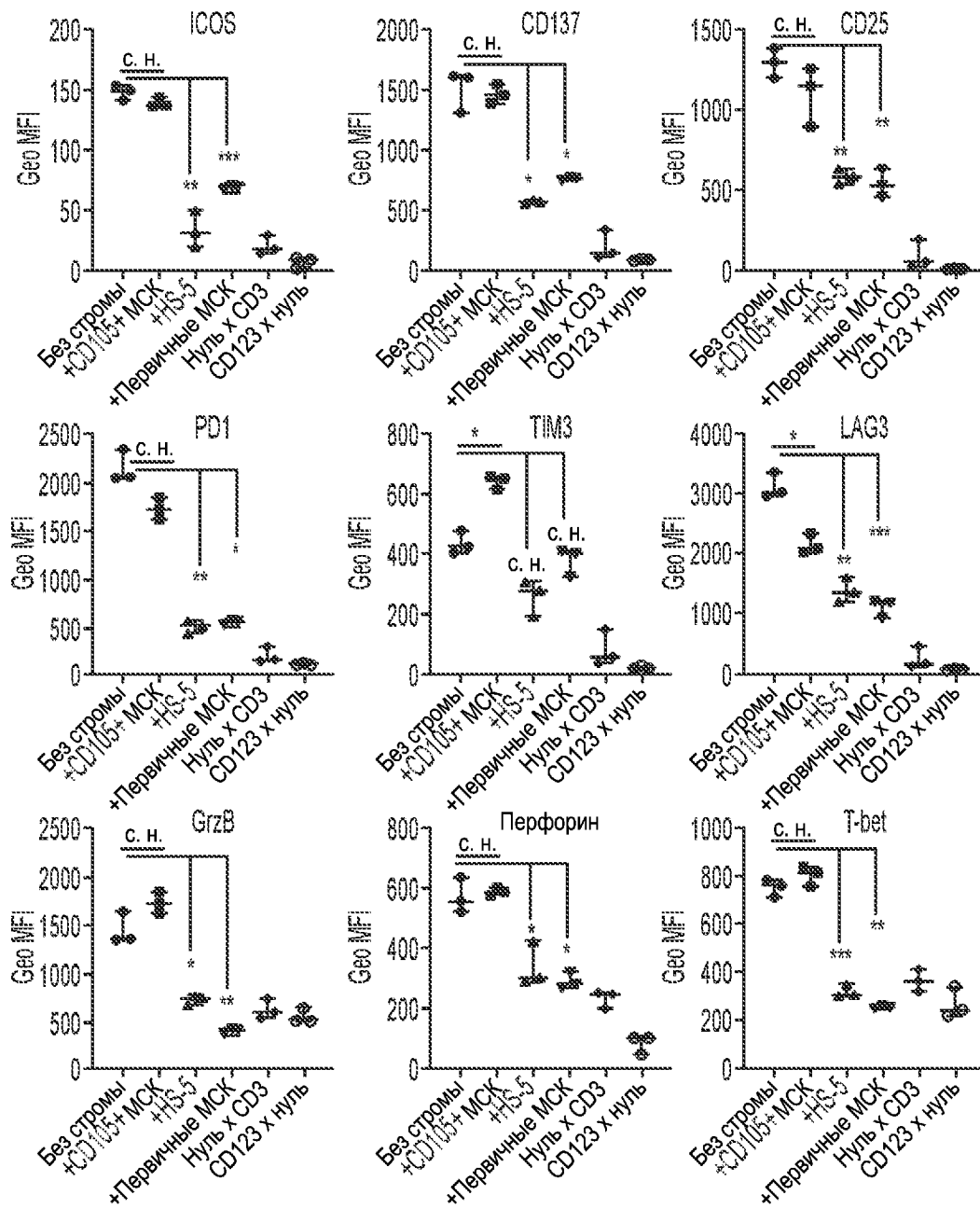
- BCMA x CD3
- BCMA x нуль
- нуль x CD3
- △— +HS-5
- +HS-27a
- ◇--- +Первичные МСК
- +Первичные МСК CD105⁺

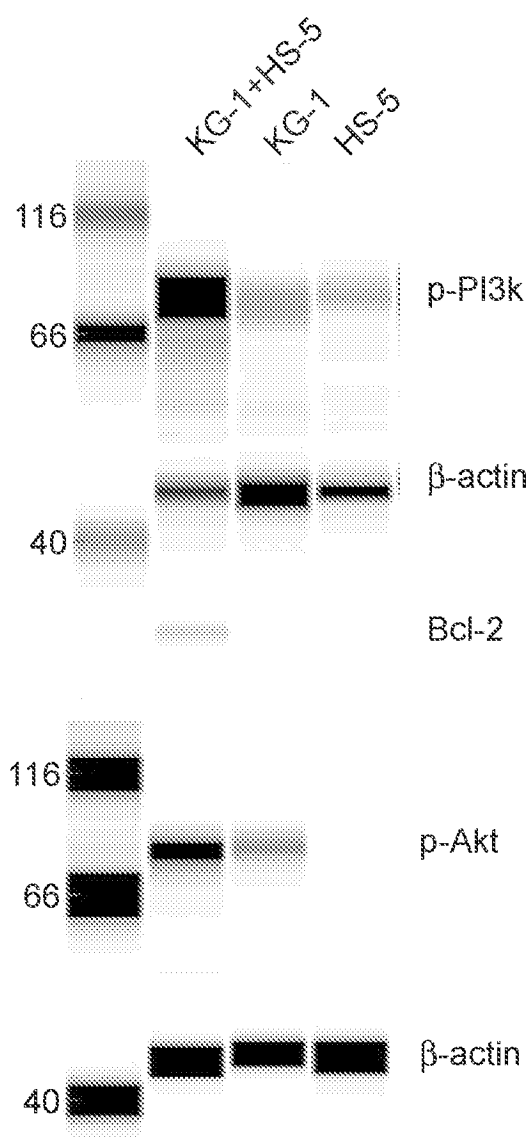
ФИГ. 1Г

H929, 133 нМ Ab

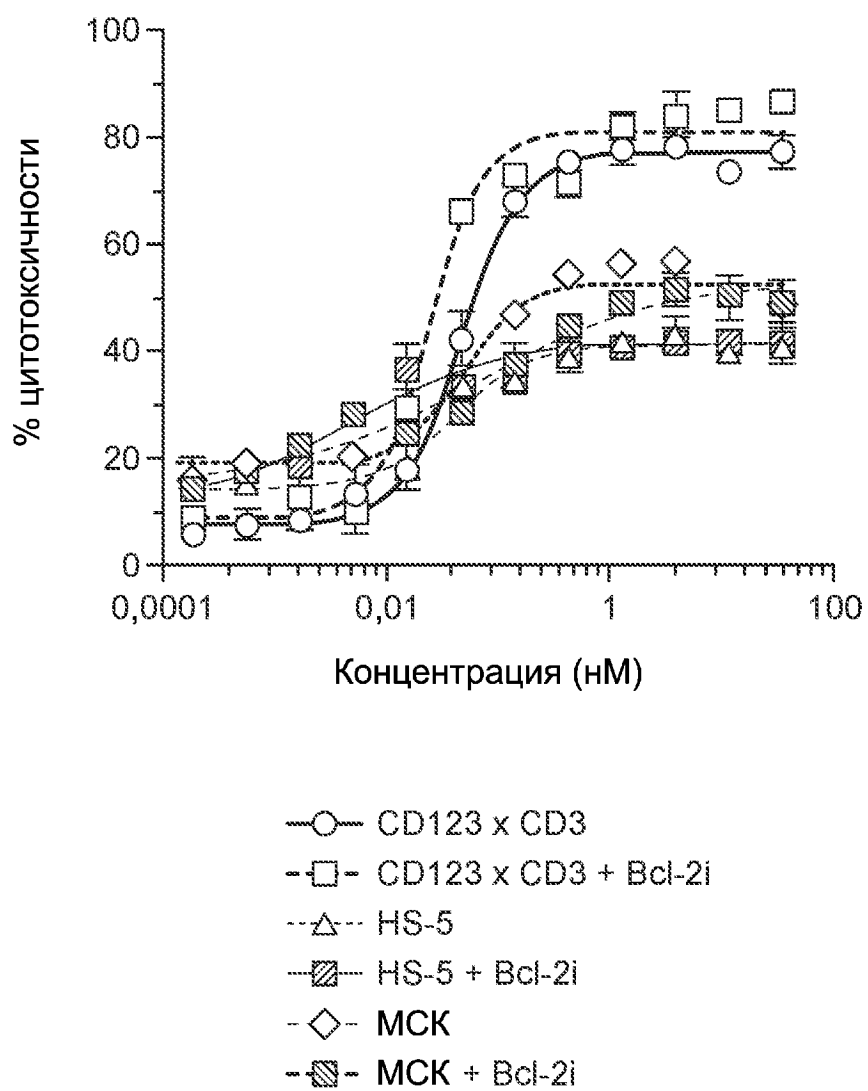


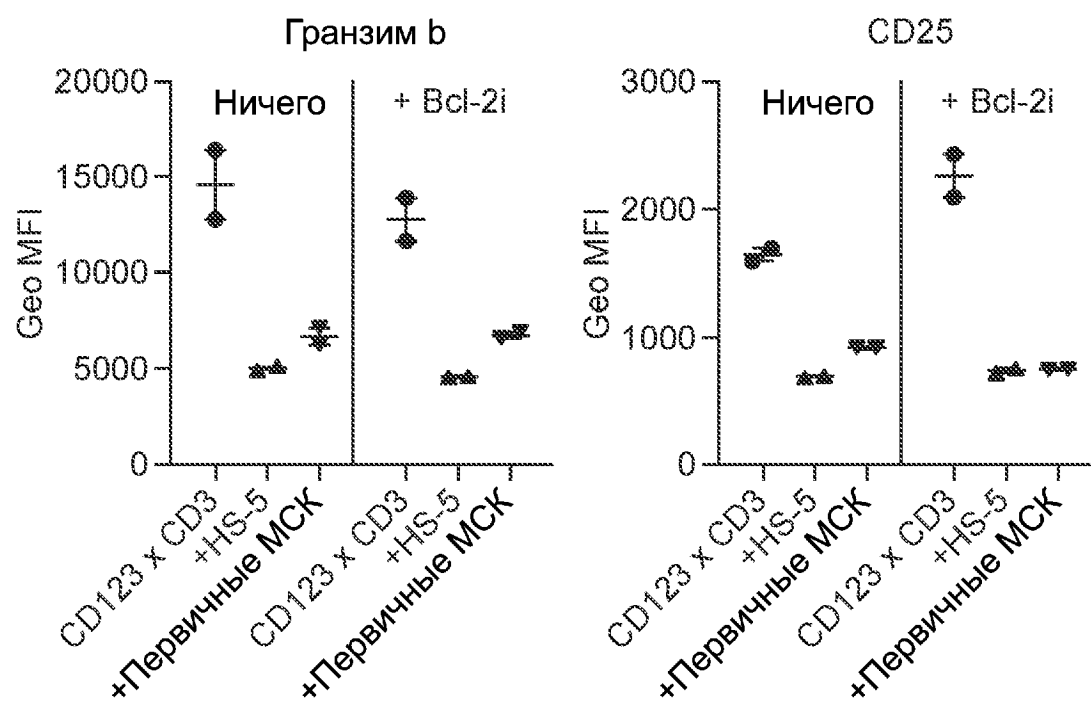
ФИГ. 2А

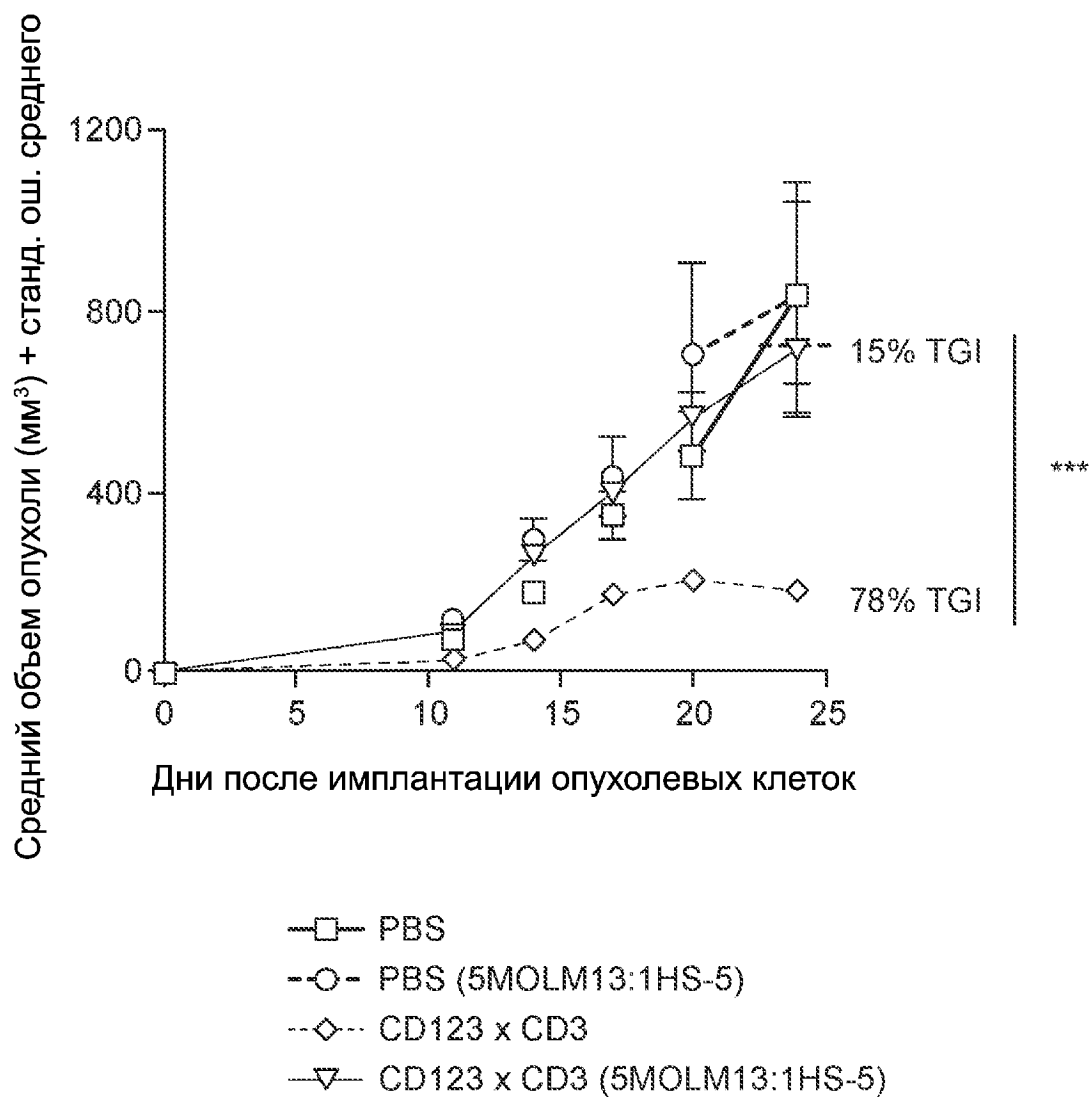


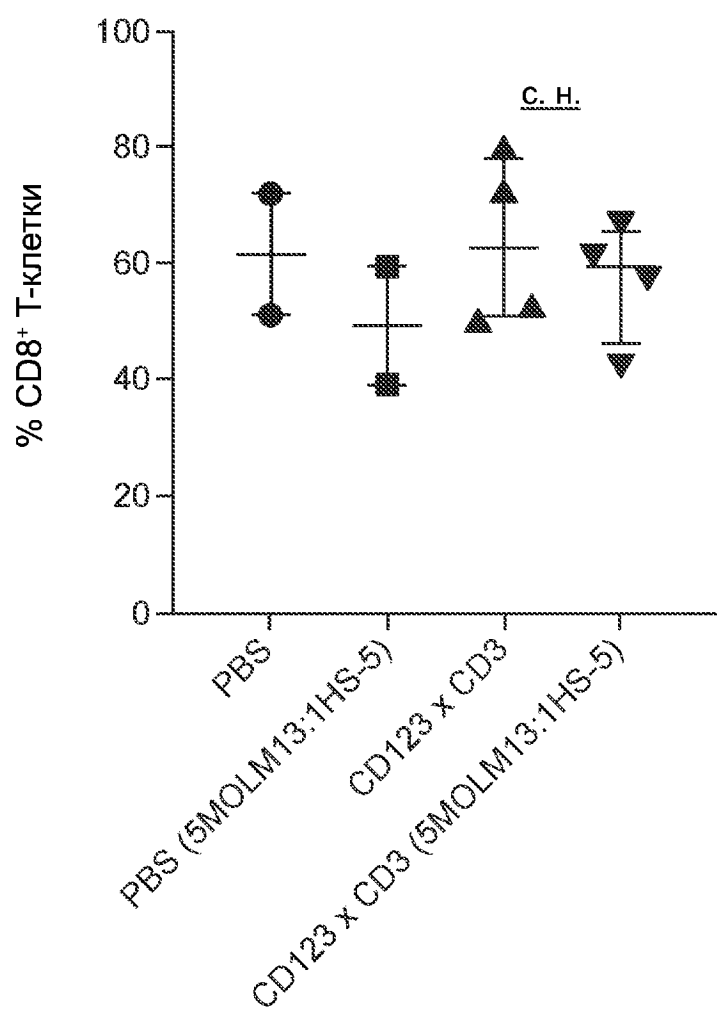
ФИГ. 2Б

ФИГ. 2В

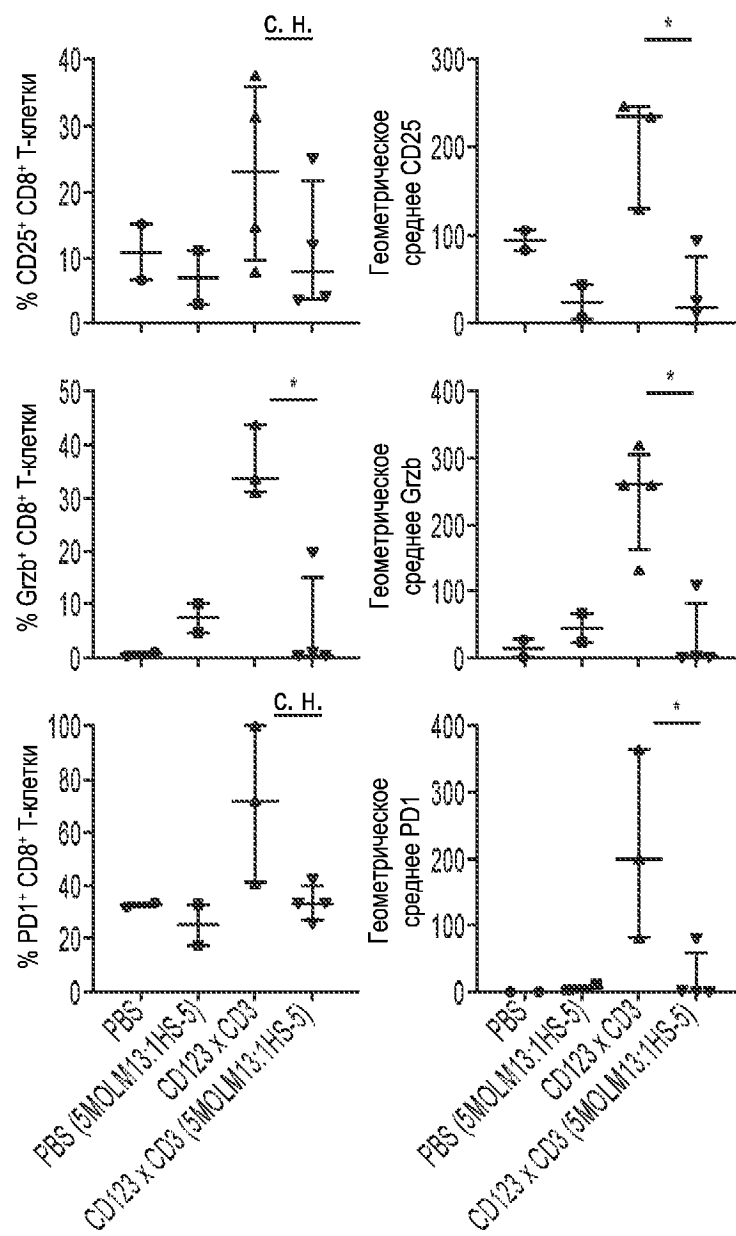


ФИГ. 2Г

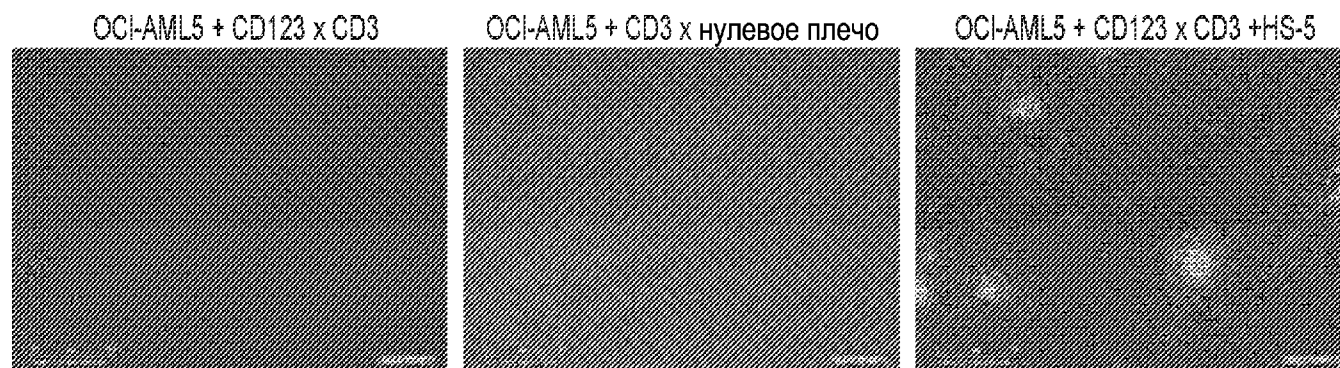
ФИГ. 3А

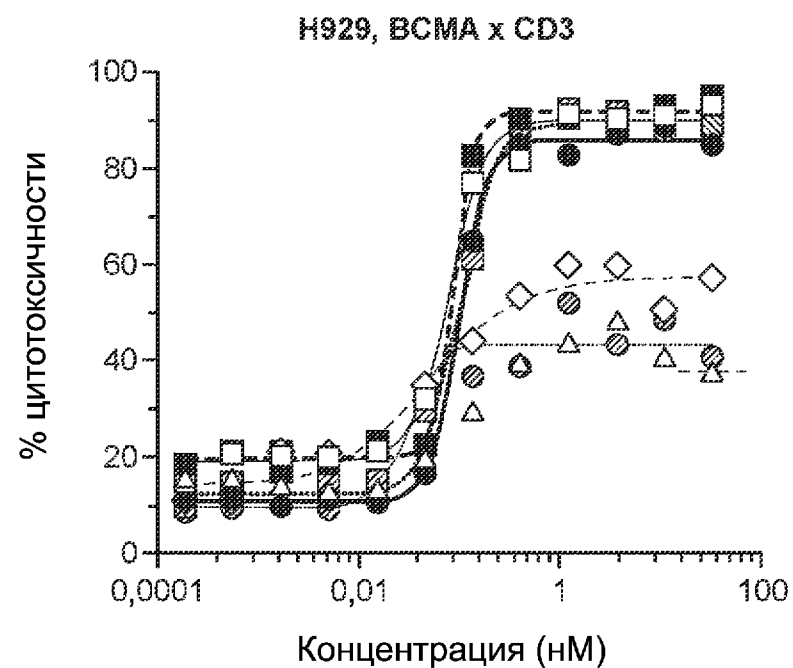
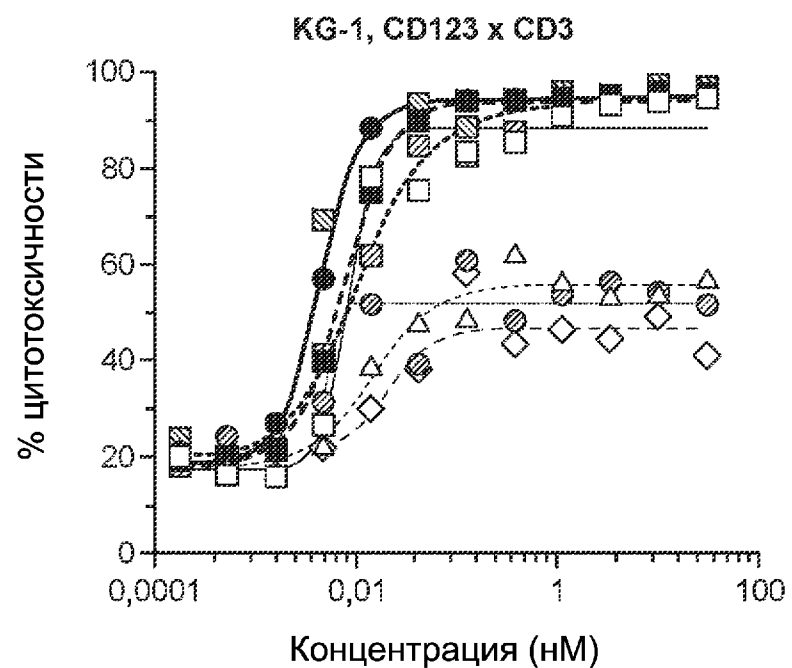
ФИГ. 3Б

ФИГ. 3В



ФИГ. 4А

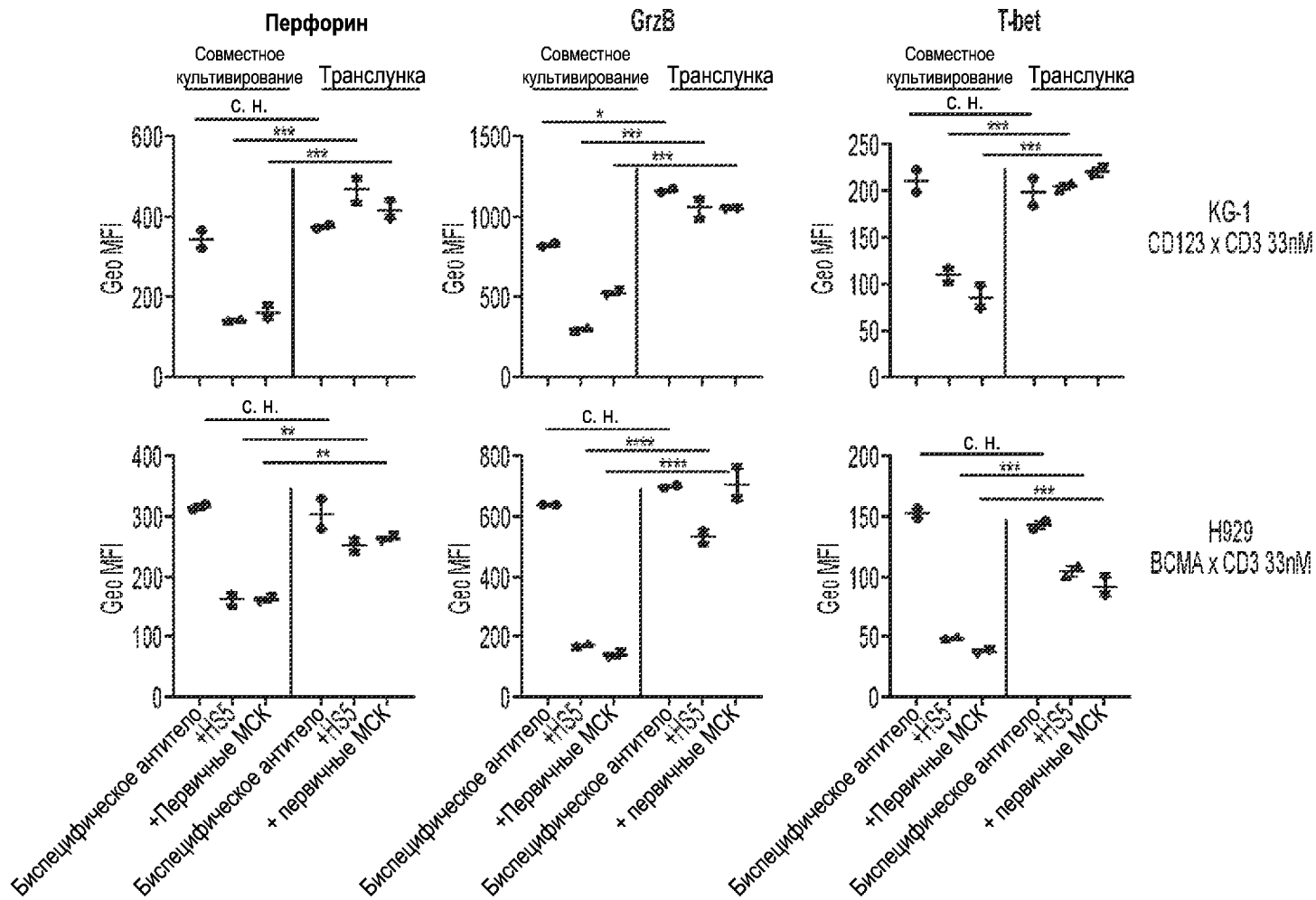




ФИГ. 4Б

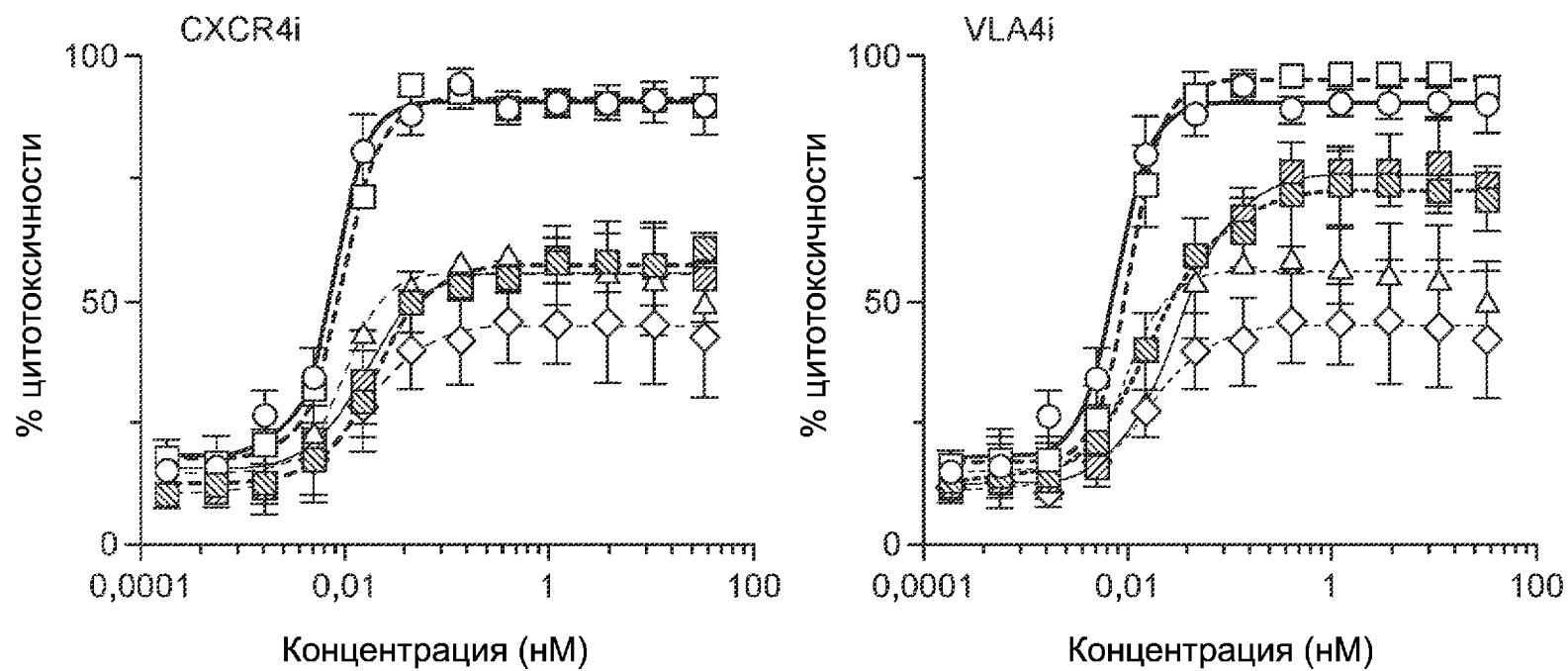
- CD123 x CD3, BCMA x CD3
- Транслунки CD123 x CD3, BCMA x CD3
- △-- +HS-5
- +HS-5 транслунка
- ◇- +Первичные МСК
- ▨-- +Транслунка МСК
- +HS-27A
- ▨- +HS-27A транслунка

ФИГ. 4В



—○— CD123 x CD3 -△- +HS-5 -◇- +MCK
 -□- CD123 x CD3 + лечение -▨- +HS-5 + лечение -▩- +MCK + лечение

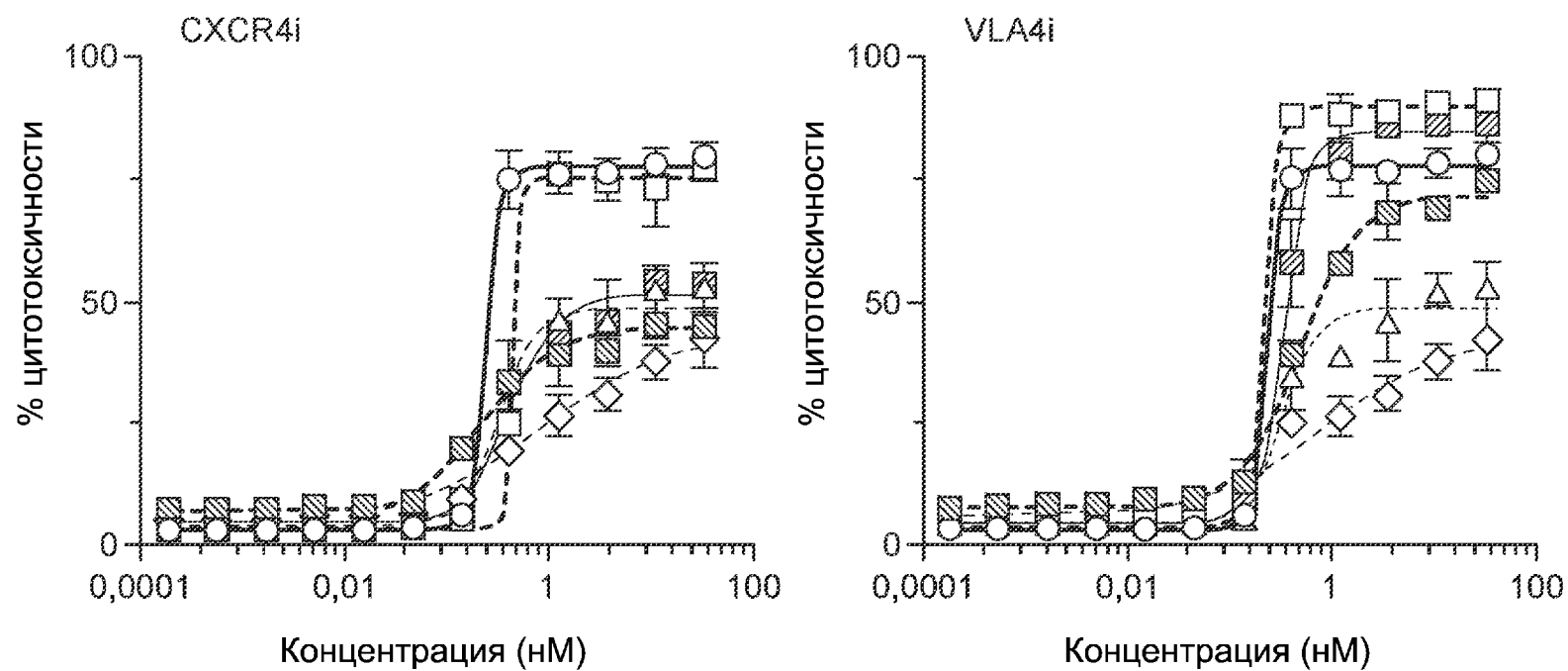
KG-1, CD123 x CD3



ФИГ. 5А

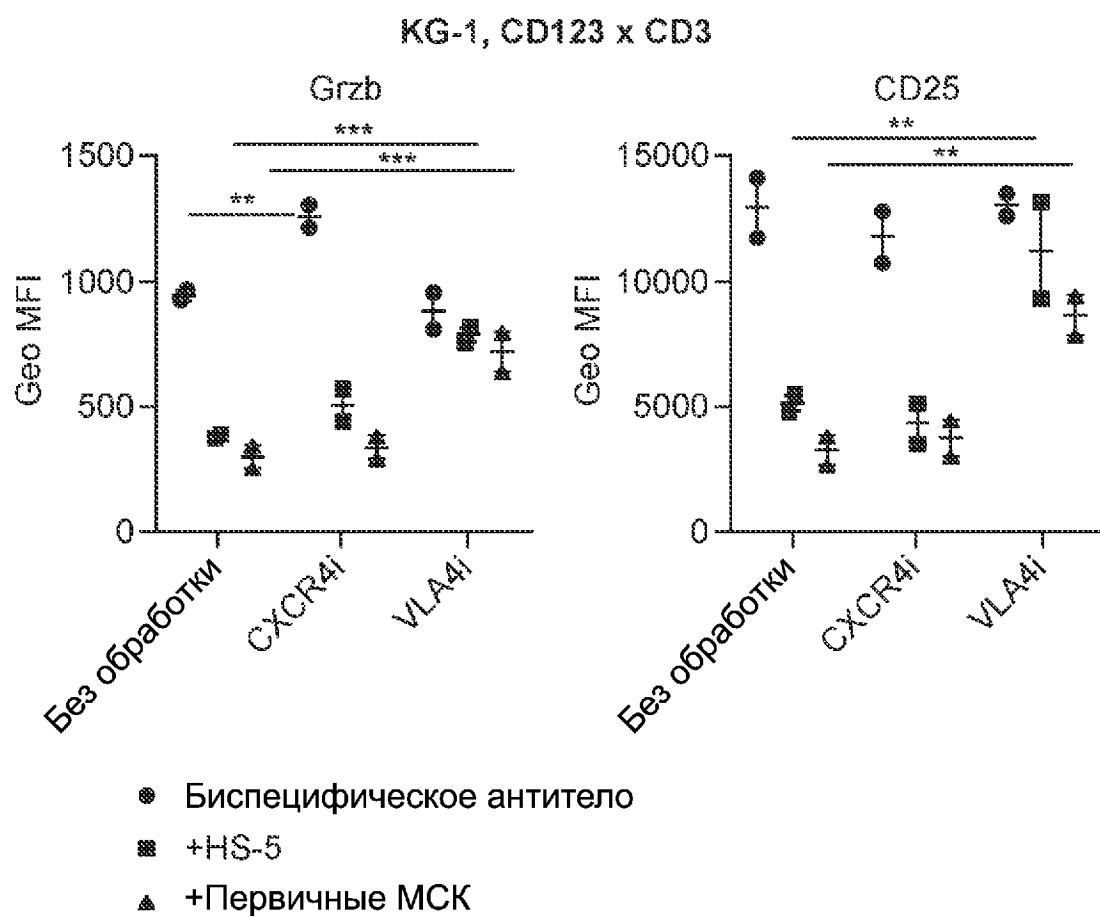
—○— BCMA x CD3 -△- +HS-5 -◇- +MCK
 -□- BCMA x CD3 + лечение -▨- +HS-5 + лечение -▩- +MCK + лечение

H929, BCMA x CD3

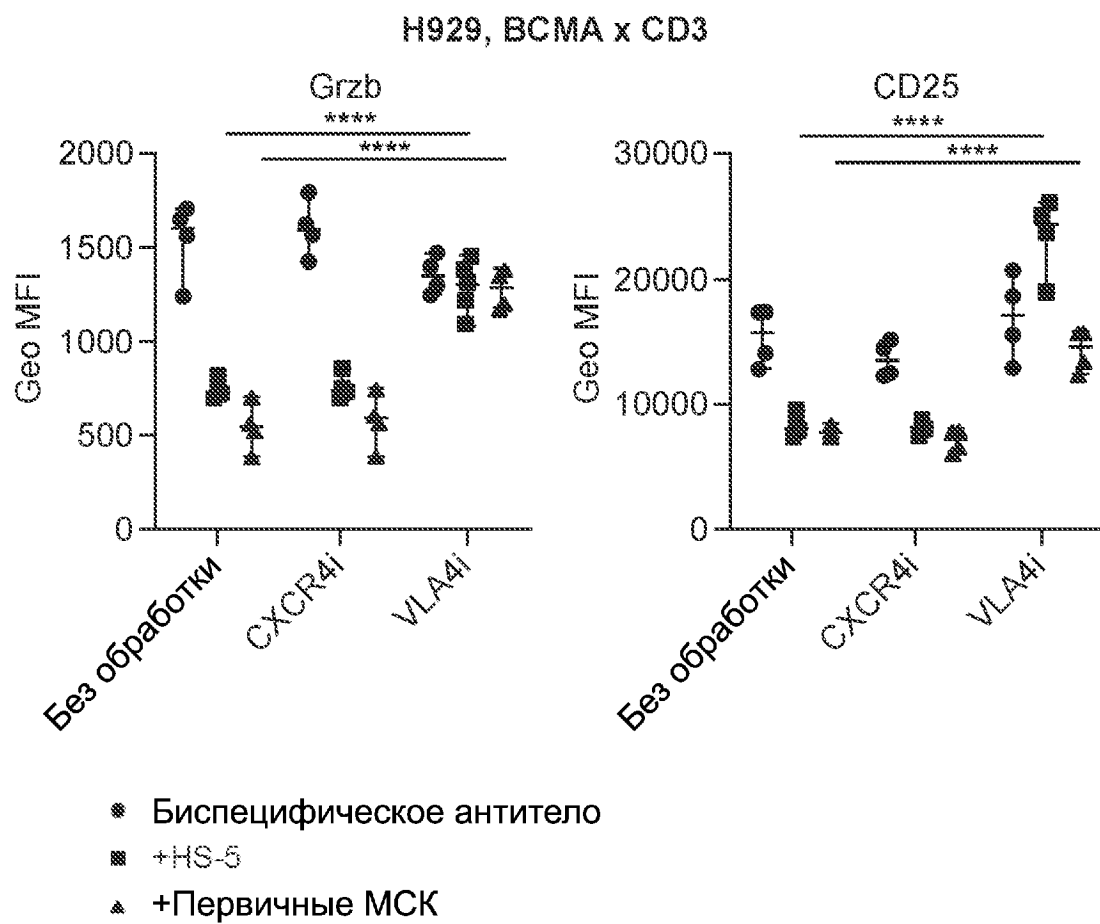


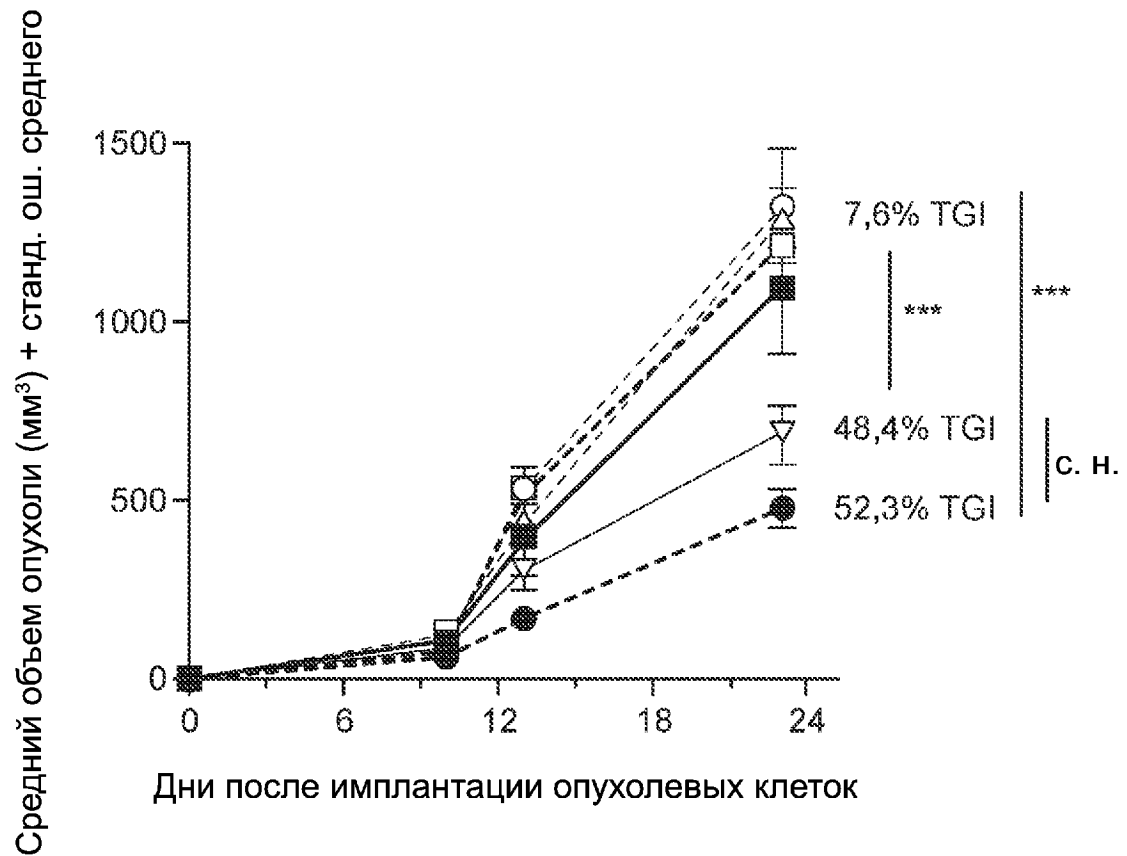
ФИГ. 5Б

ФИГ. 5В



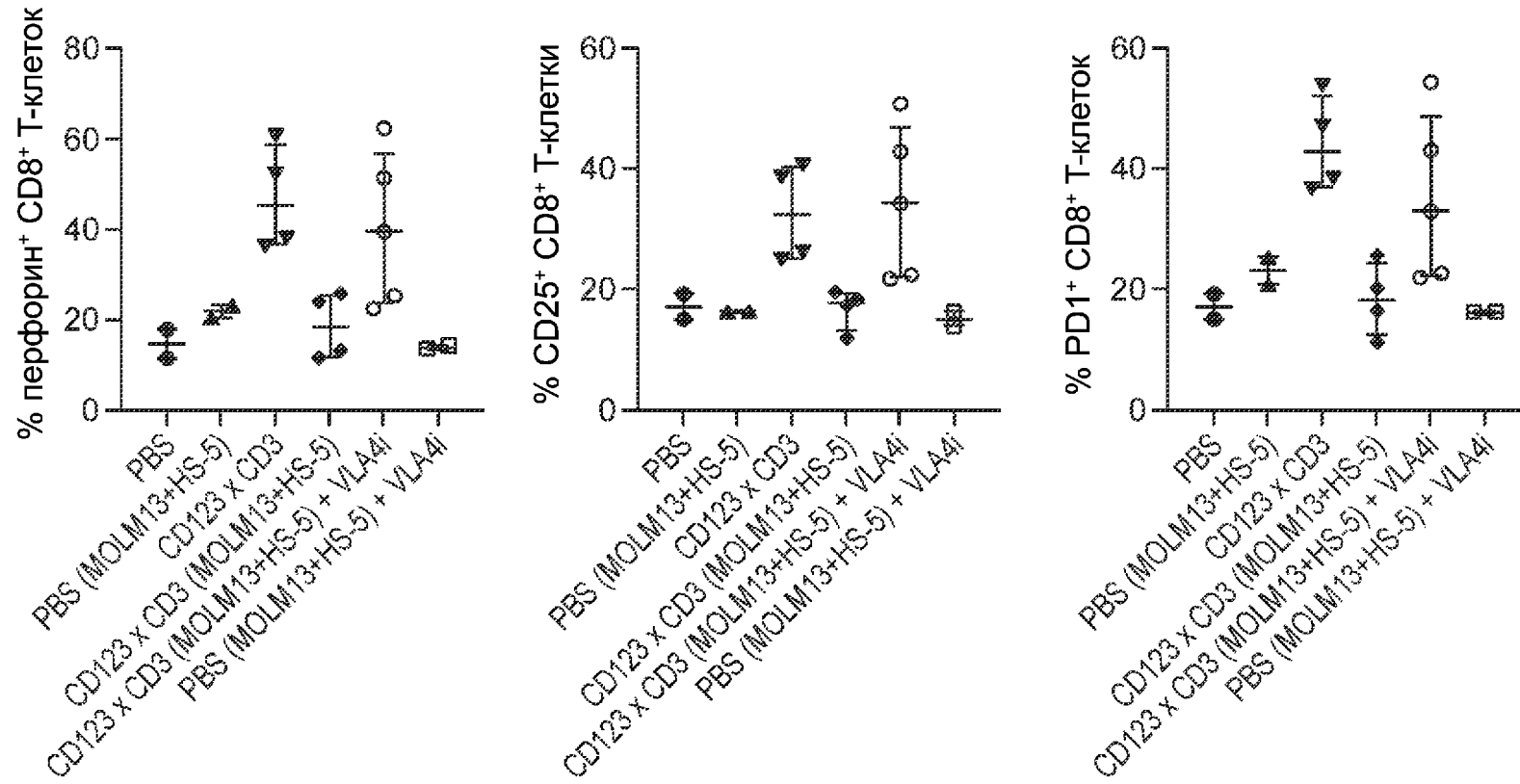
ФИГ. 5Г

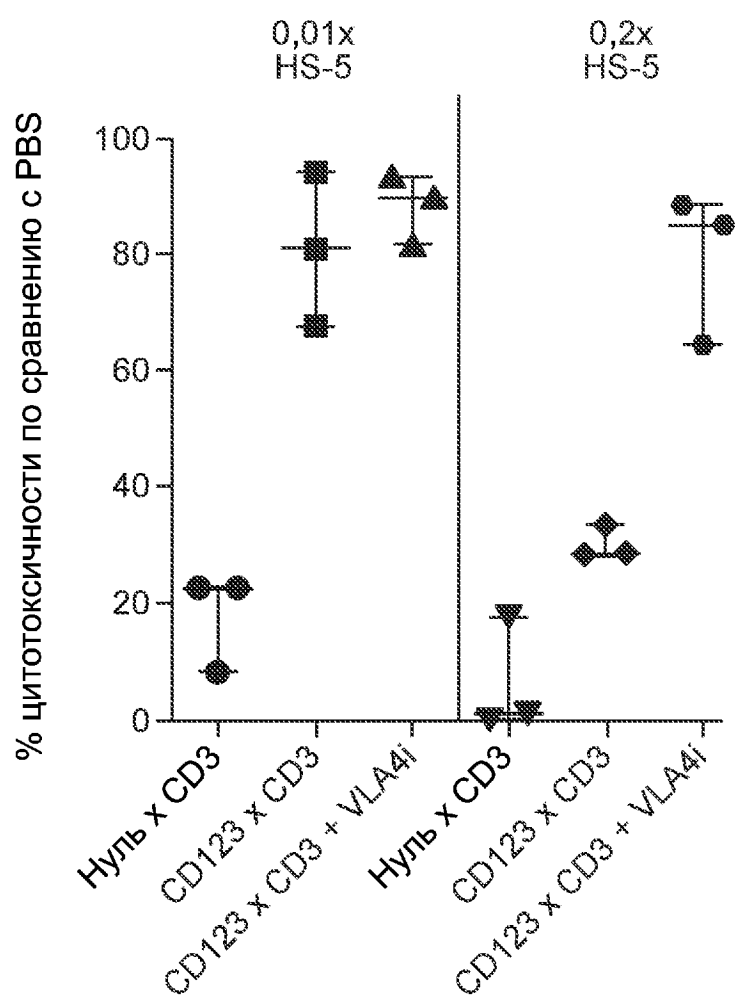


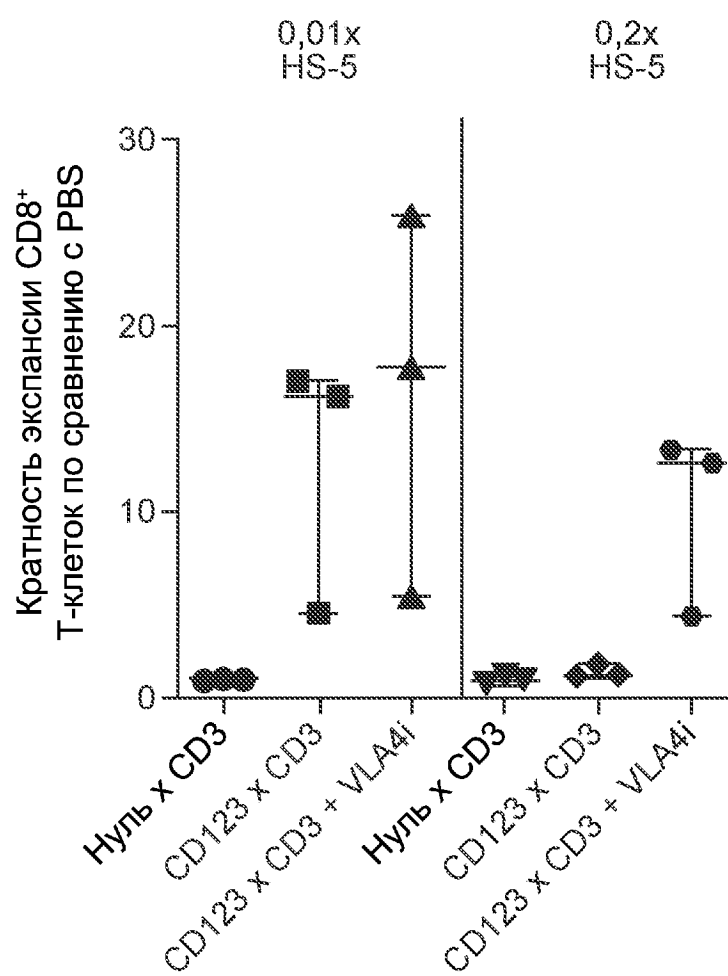
ФИГ. 6А

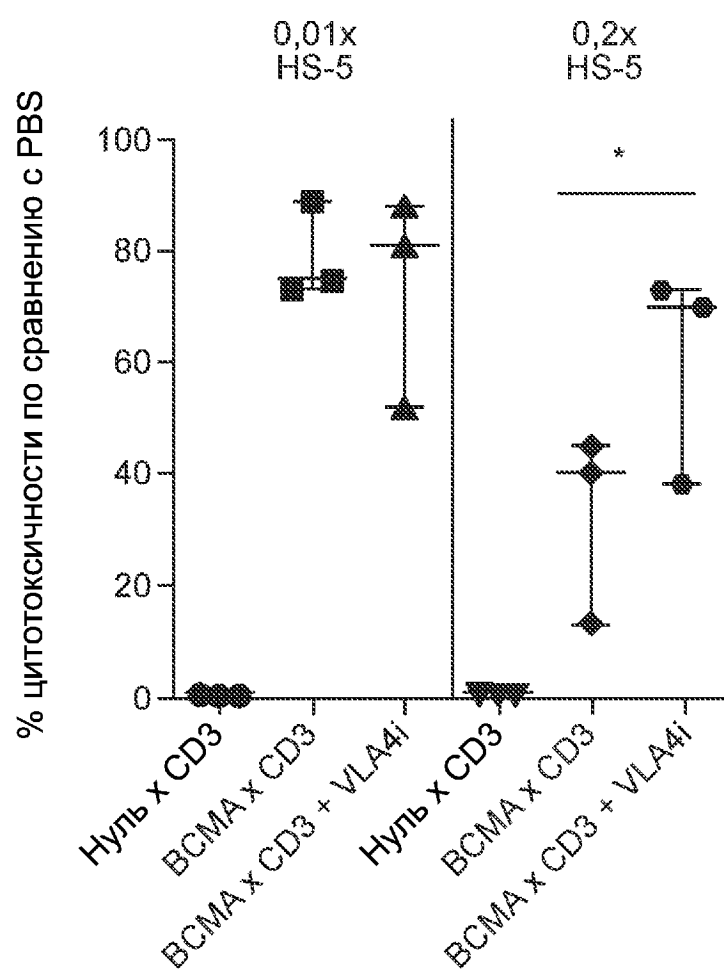
- PBS (MOLM13)
- CD123 x CD3
- △-- CD123 x CD3 (MOLM13 + HS-5)
- ▽--- CD123 x CD3 (MOLM13 + HS-5) + VLA4i
- PBS (MOLM13 + HS-5)
- PBS (MOLM13+HS-5) + VLA4i

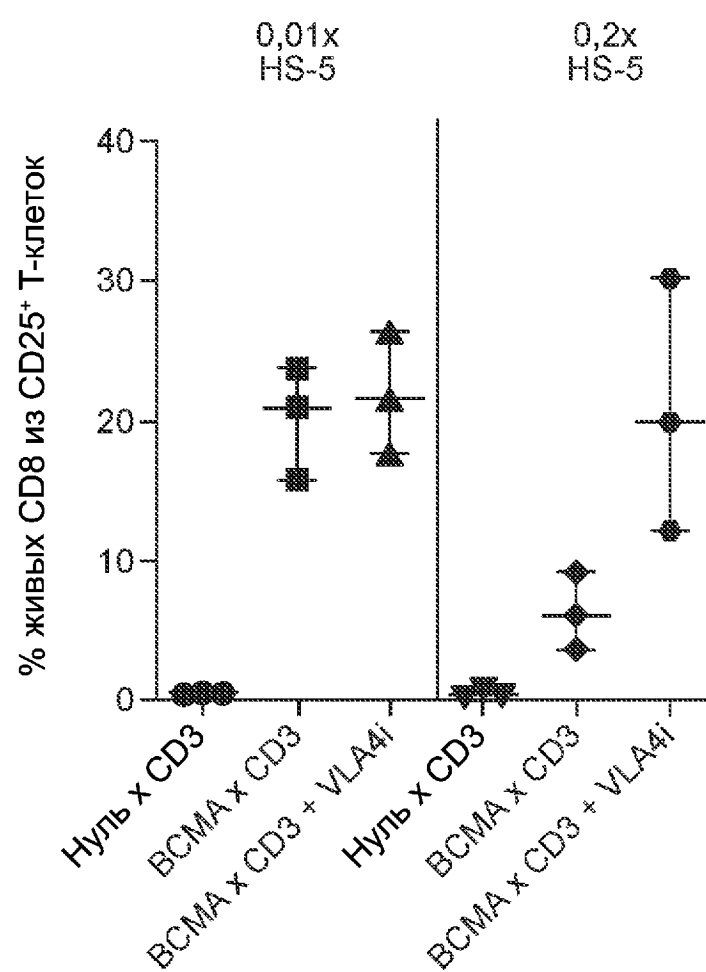
ФИГ. 6Б

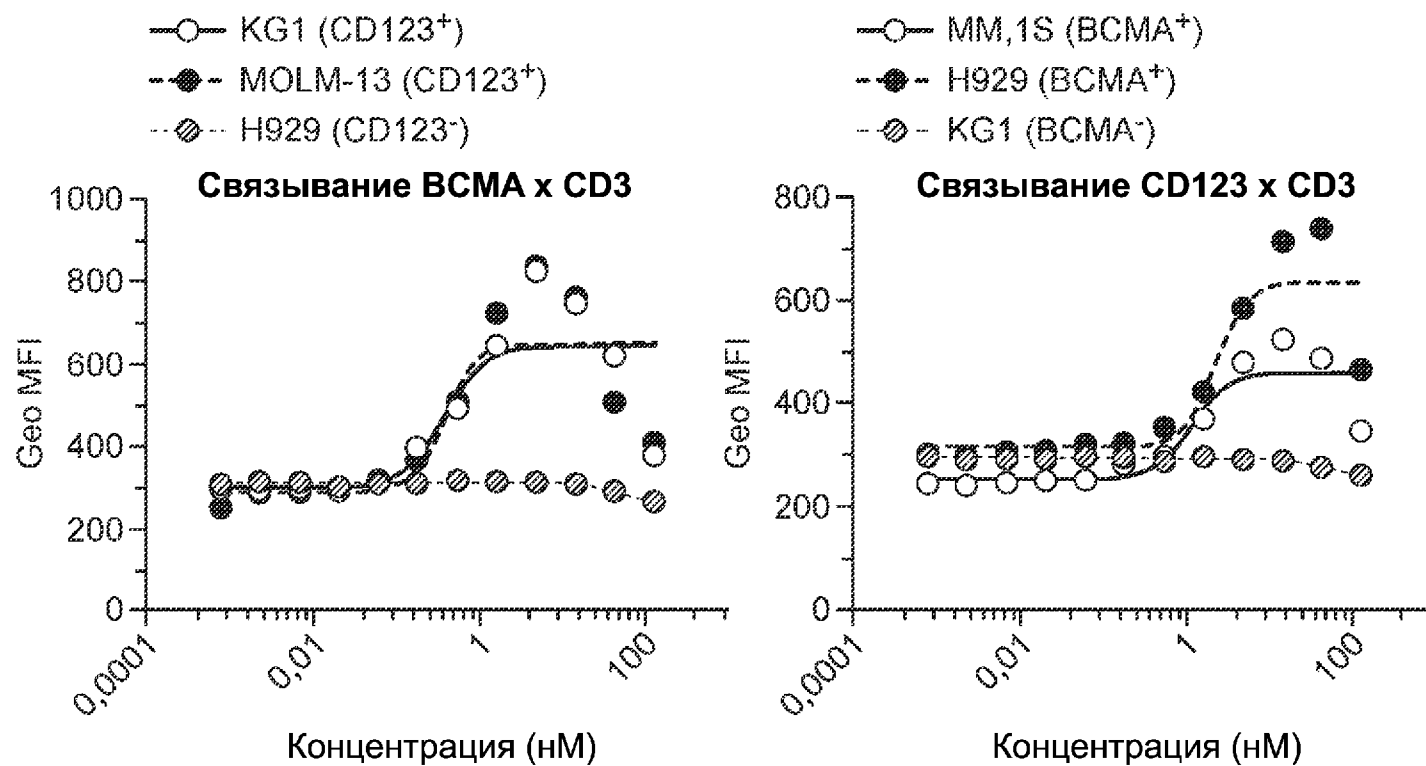


ФИГ. 7А

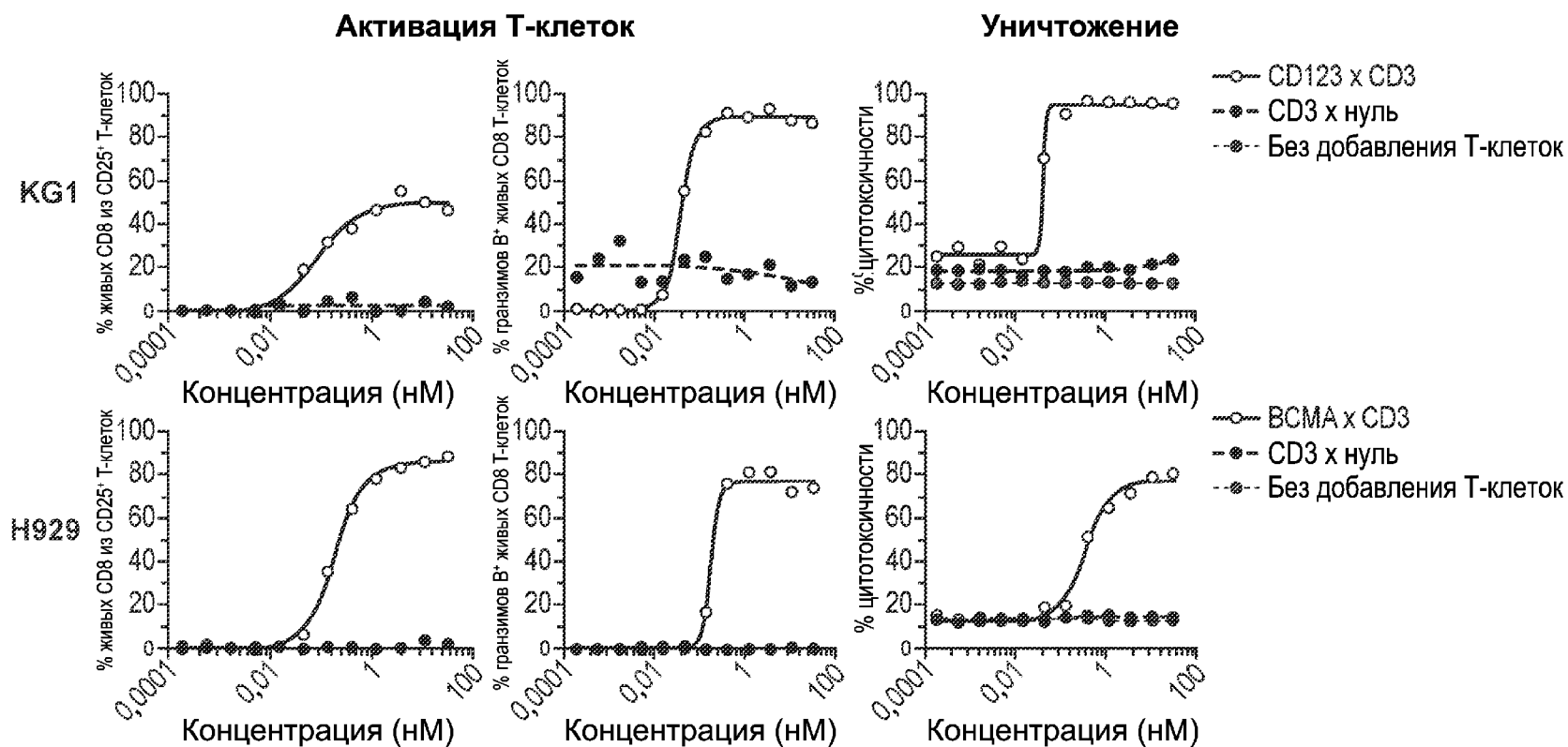
ФИГ. 7В

ФИГ. 7В

ФИГ. 7Г



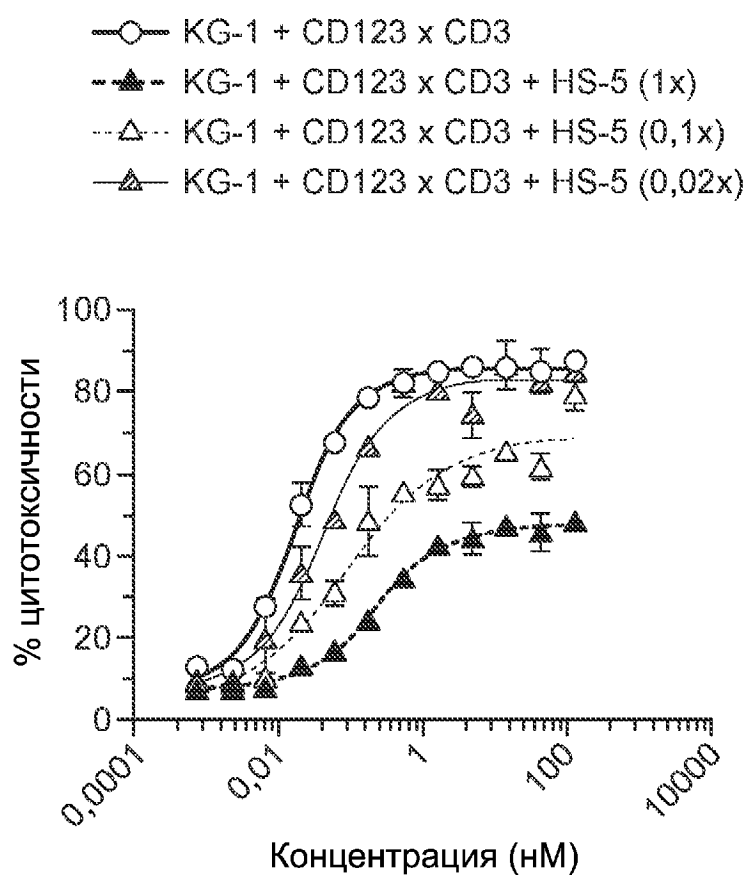
ФИГ. 8А

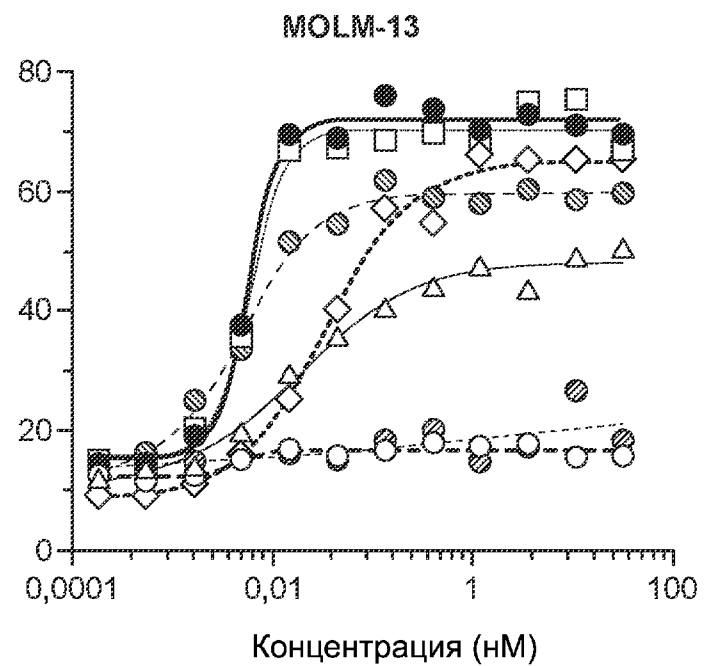
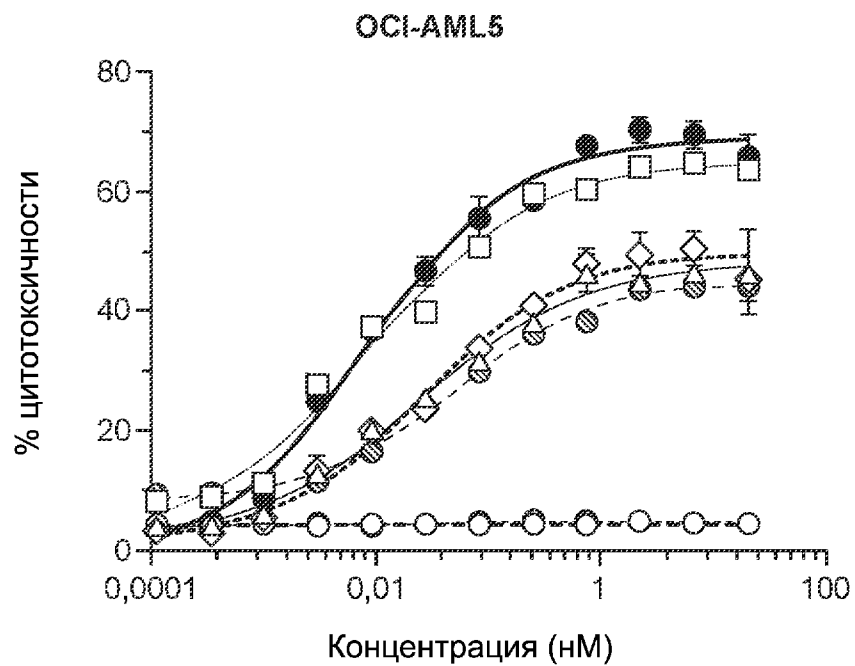


ФИГ. 8Б

ФИГ. 9А

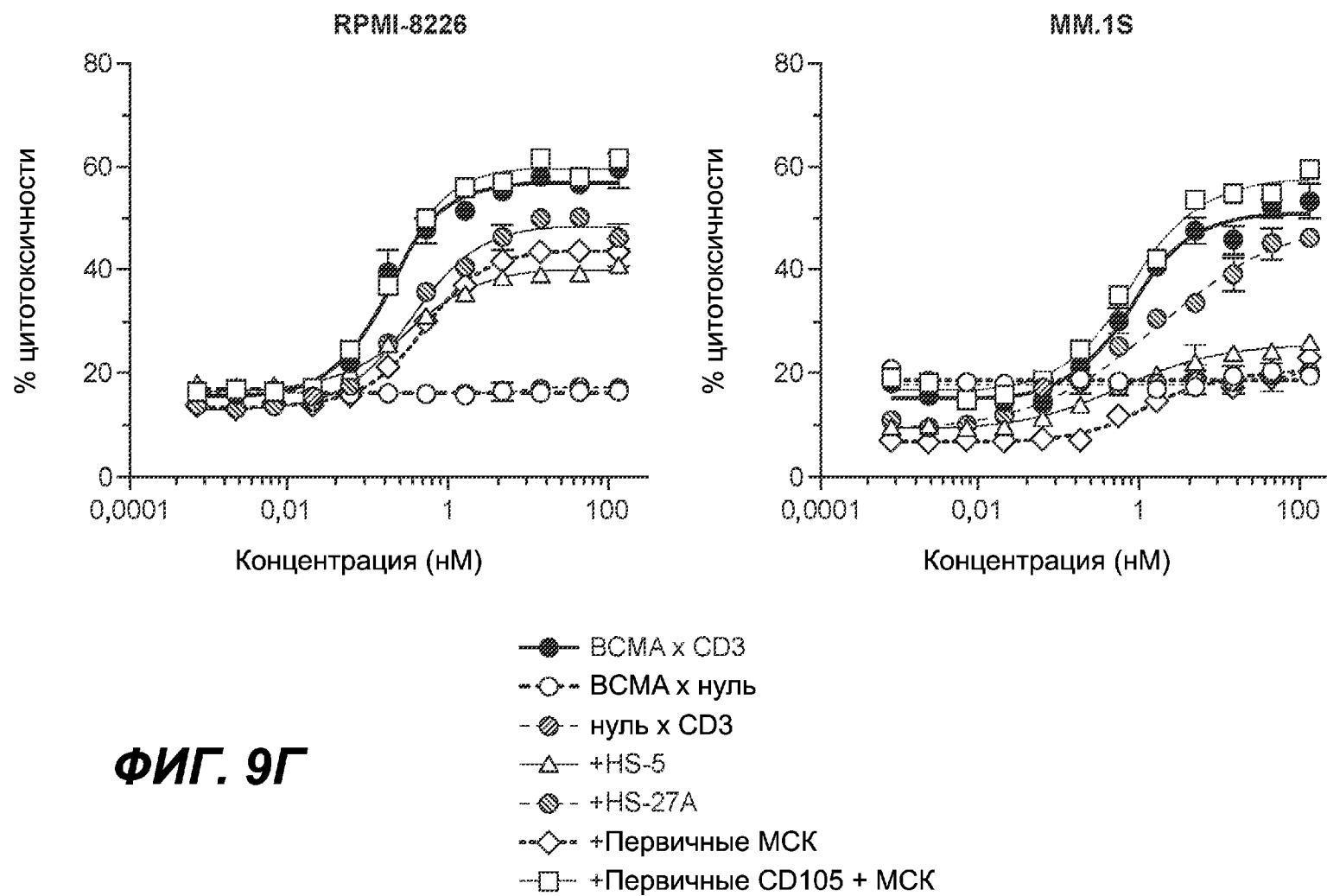
Образец	KG-1 цитотоксичность EC ₅₀ (нМ)	H929 цитотоксичность EC ₅₀ (нМ)
	CD123 x CD3	BCMA x CD3
Биспецифическое антитело	0,005	0,23
Биспецифическое антитело + HS-5	0,02	0,70
Биспецифическое антитело HS-27a	0,03	0,30
Биспецифическое антитело + MCK	0,03	1,23
Биспецифическое антитело + CD105 ⁺ эндотелиальные клетки	0,008	0,17
	N = 3 донора Т-клеток	

ФИГ. 9Б



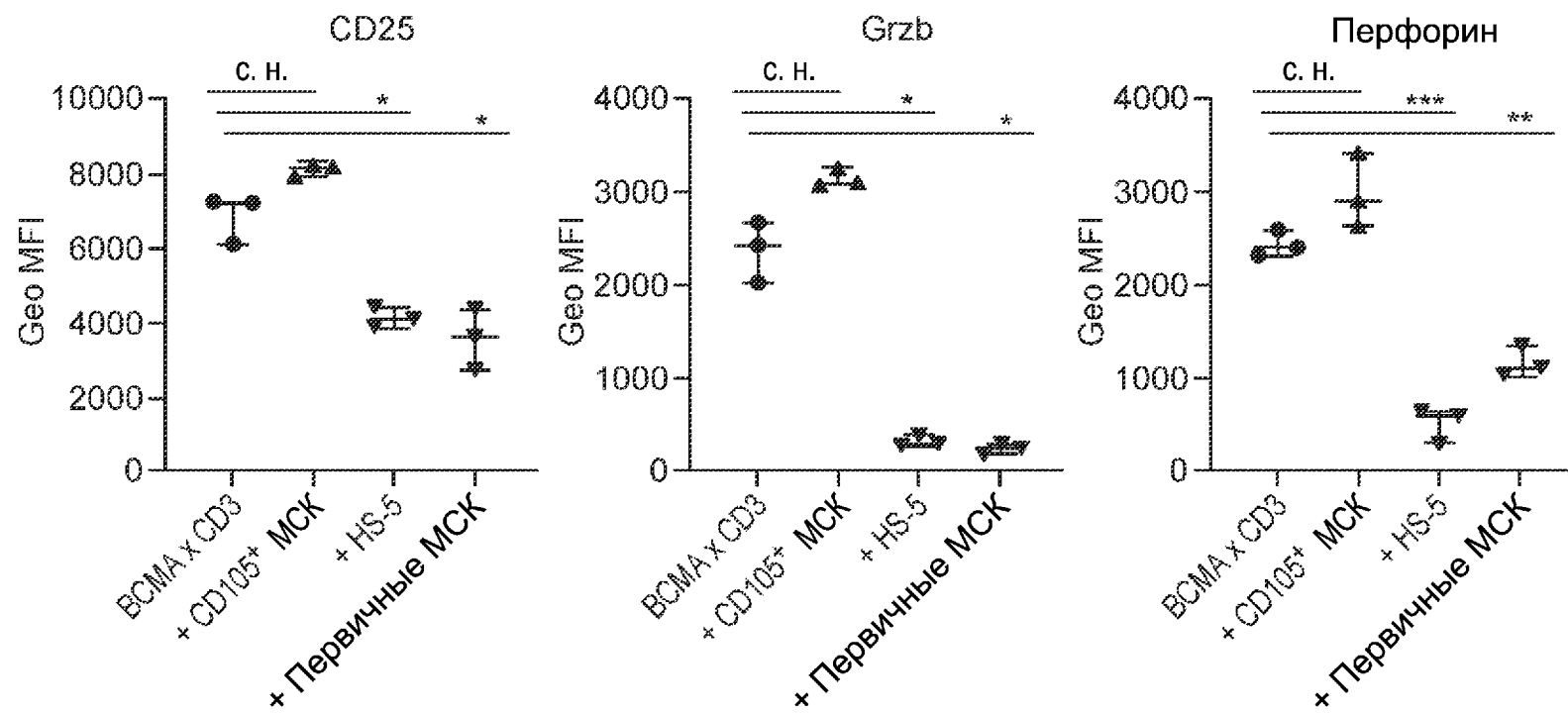
ФИГ. 9В

- CD123 x CD3
- CD123 x нуль
- нуль x CD3
- △- +HS-5
- +HS-27A
- ◇- +Первичные MCK
- +Первичные CD105 + MCK

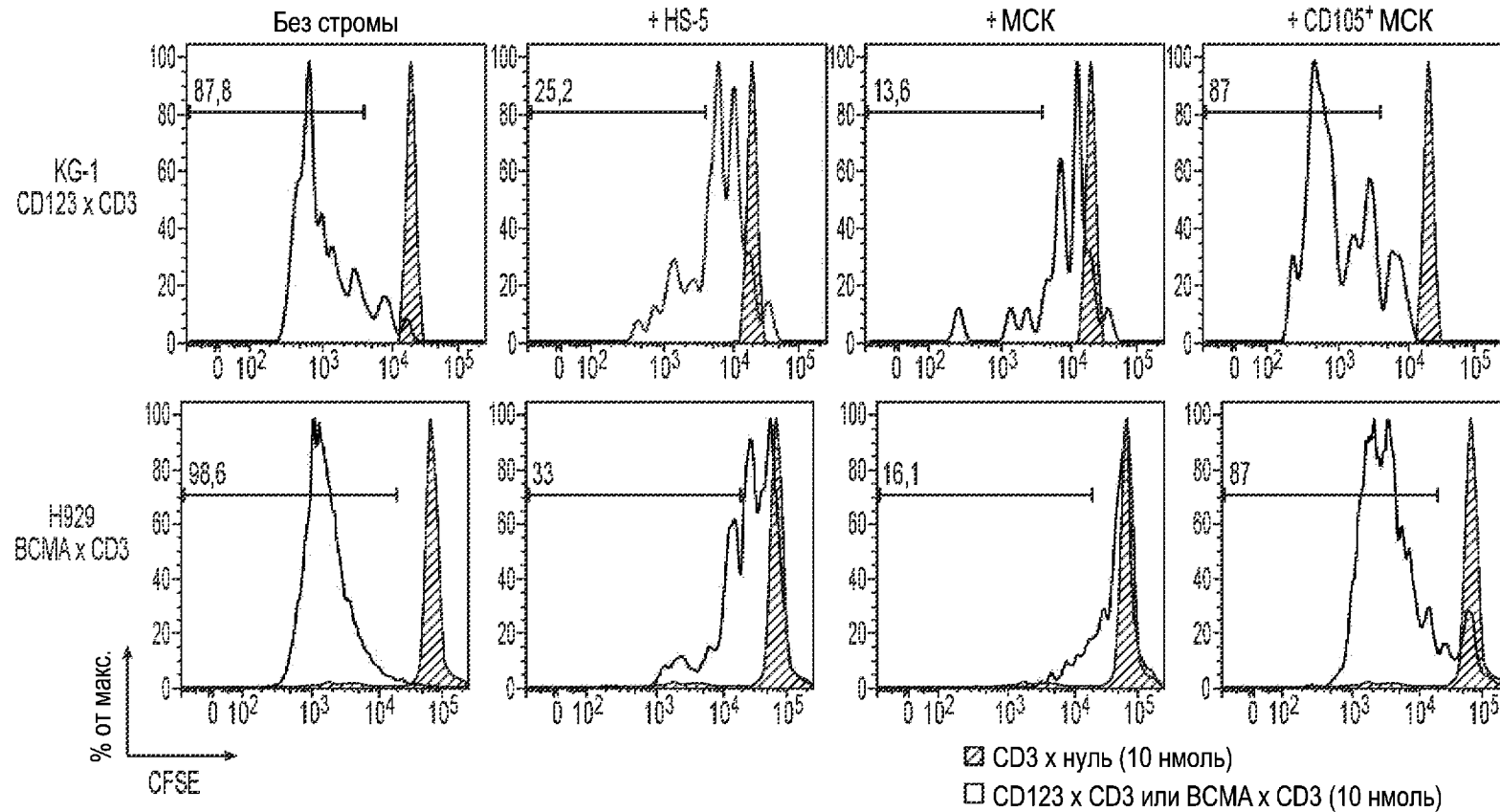


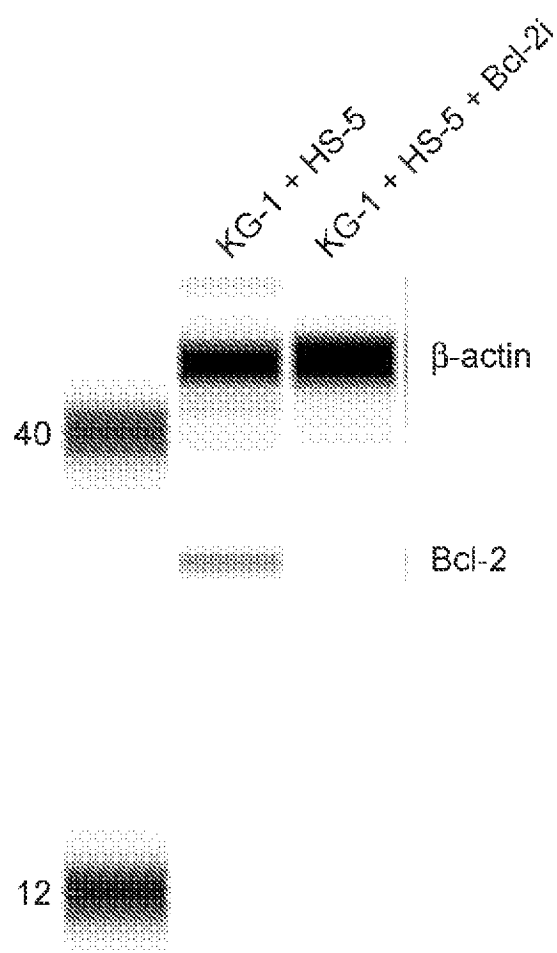
ФИГ. 9Г

ФИГ. 10А

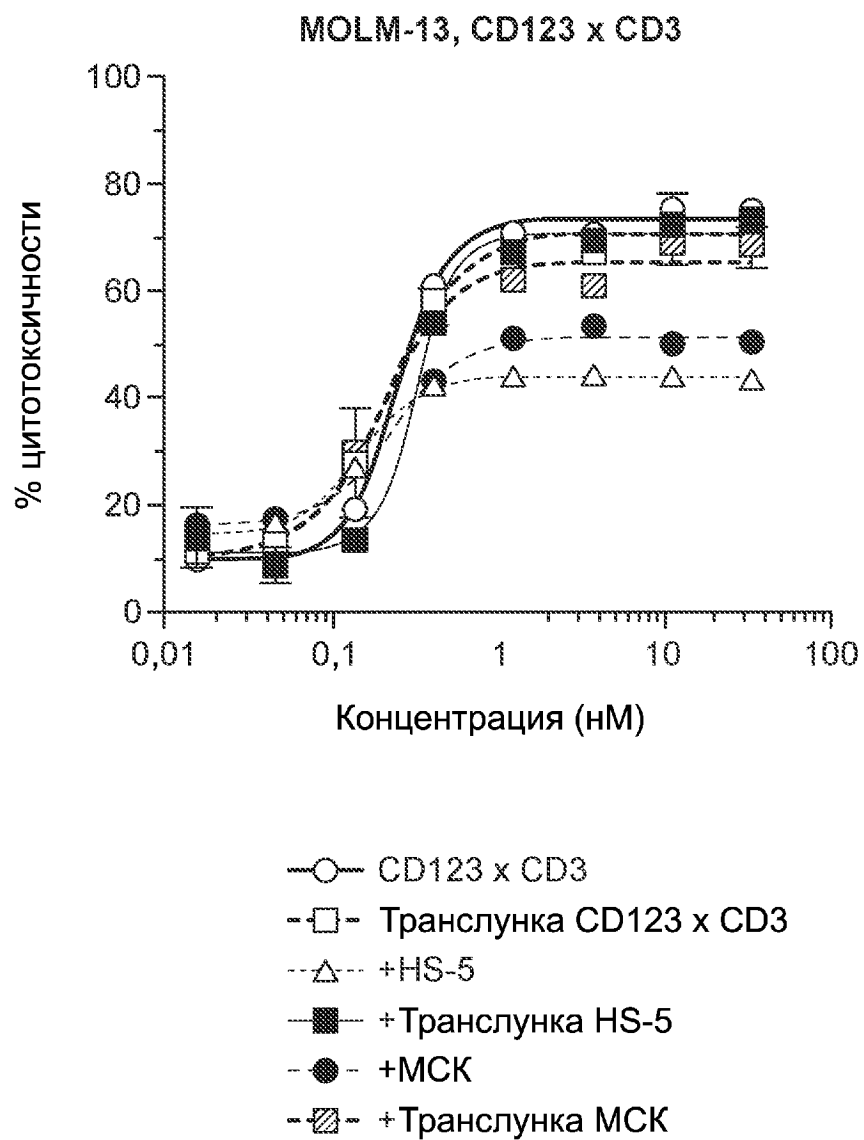


ФИГ. 10Б



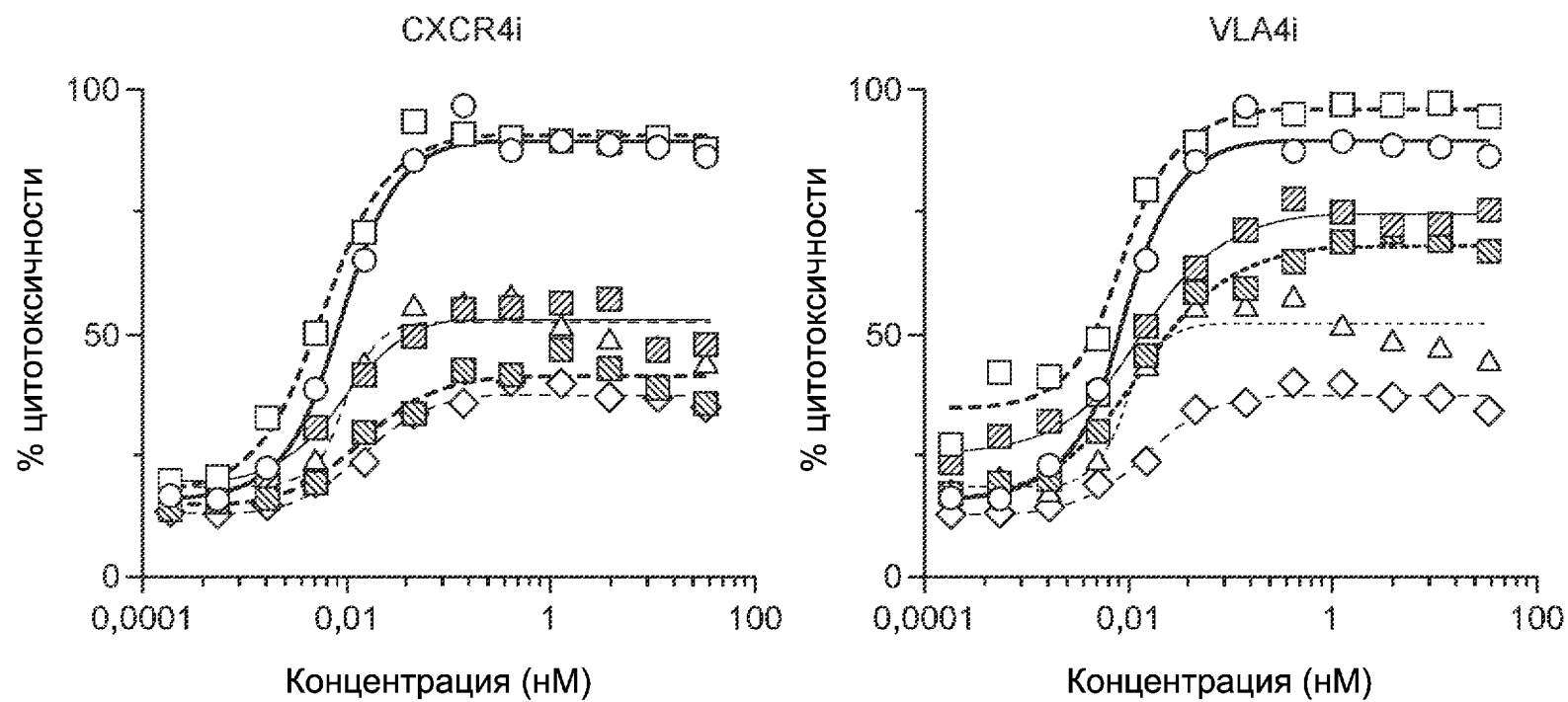
**ФИГ. 11**

ФИГ. 12А

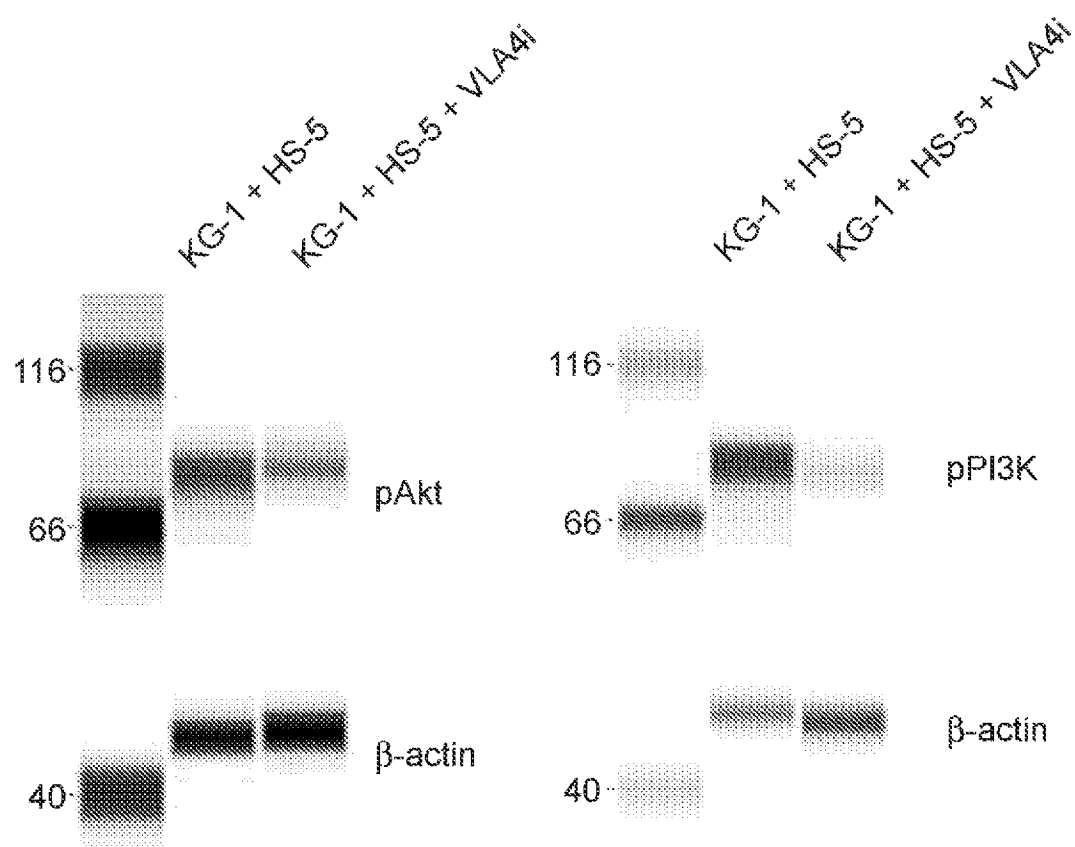


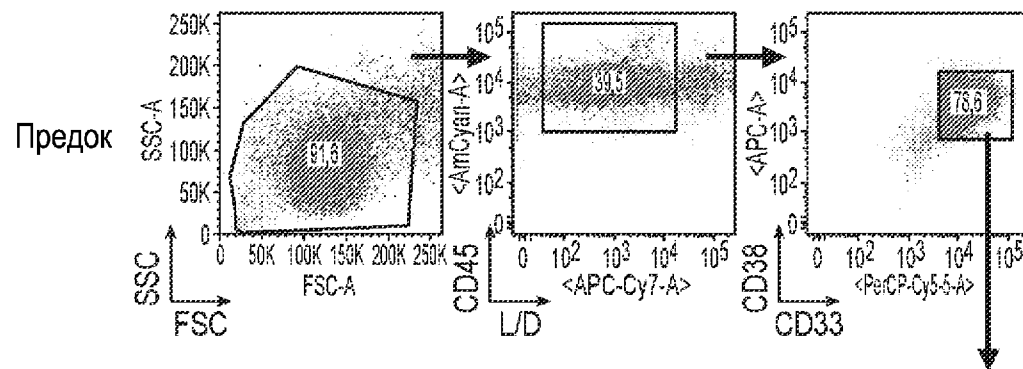
—○— CD123 x CD3 -△- - +HS-5 -◇- - +MCK
 -□- - CD123 x CD3 + лечение -▨- - +HS-5 + лечение -▩- - +MCK + лечение

MOLM-13, CD123 x CD3



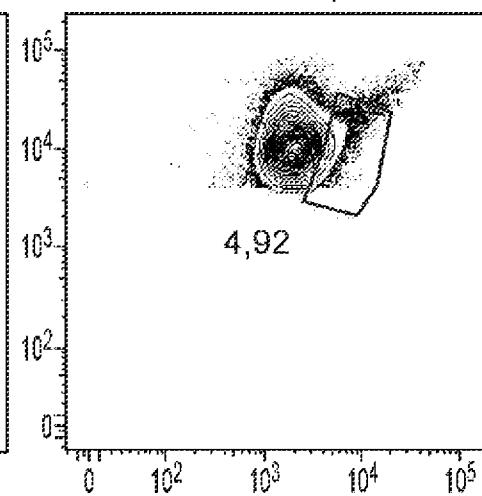
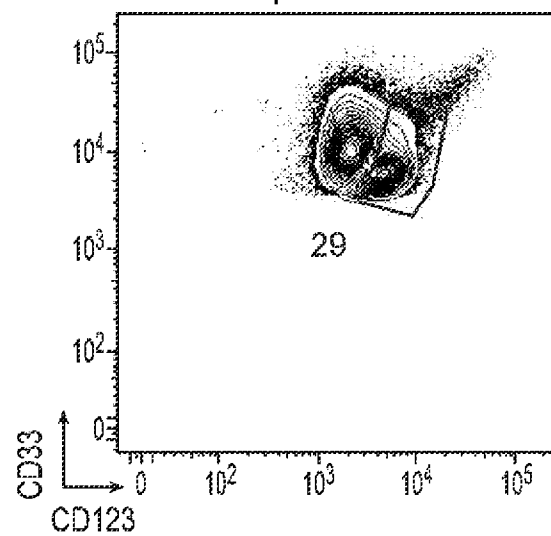
ФИГ. 12Б

**ФИГ. 13**



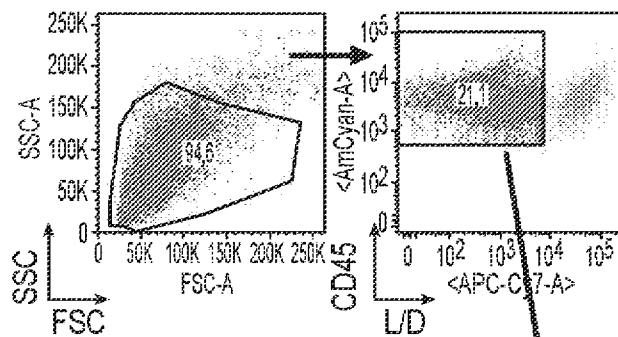
С окрашиванием

Изотипический контроль CD123

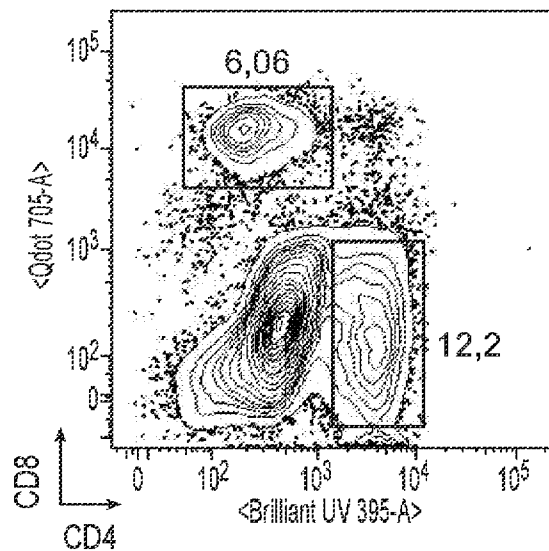


ФИГ. 14А

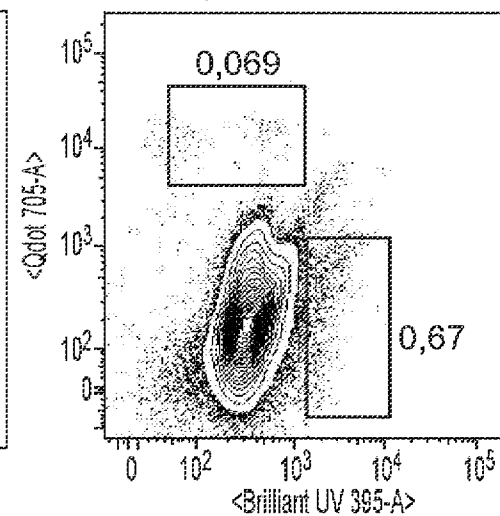
Предок



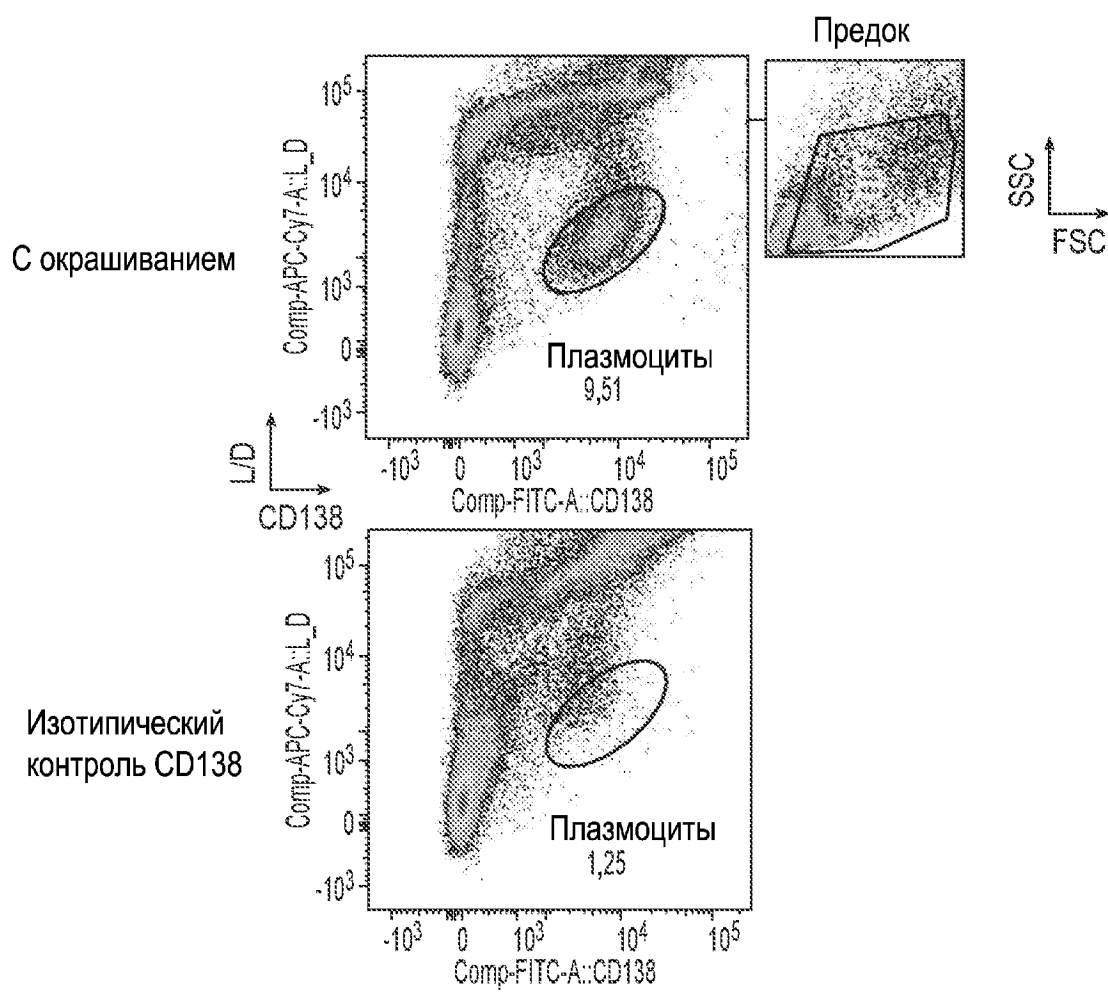
С окрашиванием



Изотипический контроль CD4 и CD8



ФИГ. 14Б

ФИГ. 15А

ФИГ. 15Б

