



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/395 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018144313, 14.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.11.2009

Дата регистрации:
20.11.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

07.11.2008 US 61/112,323;

02.06.2009 US 61/183,291;

29.06.2009 US 61/221,269

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:

2014141180 07.11.2008

(43) Дата публикации заявки: 15.06.2020 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 20.11.2020 Бюл. № 32

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
строение 3, ООО "Юридическая фирма
Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЦУГМАЙЕР, Герхард (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЬЮНИК) ГМБХ
(DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2005141512 A, 20.07.2007. WO
199954440 A1, 28.10.1999. ANDERSON et al.
"G19.4(aCD3)XB43(aCD19) Monoclonal Antibody
Heteroconjugate Triggers CD19 Antigen-Specific
Lysis of t(4;11) Acute Lymphoblastic Leukemia
Cells by Activated CD3 Antigen-Positive
Cytotoxic T Cells"// Blood, 1992, Vol.80, No.11,
p. 2826-2834, реферат. BARGOU et al. "Tumor
(см. прод.)

(54) НОВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к онкологии, и может быть использовано для
лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL)
у детей. Предложено применение блинатумомаба
для получения фармацевтической композиции
для лечения, уменьшения интенсивности или
устранения ALL у детей-пациентов, страдающих

ALL, где указанный ALL является резистентным
к химиотерапии или трансплантации аллогенных
гемопозитических стволовых клеток (HSCT).
Использование изобретения позволяет достичь
ремиссии и устранить минимальные остаточные
проявления ALL. 13 з.п. ф-лы, 5 ил., 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody", Science, 15.08.2008, vol.321, no.5891,
p. 974-976, реферат.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/395 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)(21)(22) Application: **2018144313, 14.12.2018**

(24) Effective date for property rights:
06.11.2009

Registration date:
20.11.2020

Priority:

(30) Convention priority:
07.11.2008 US 61/112,323;
02.06.2009 US 61/183,291;
29.06.2009 US 61/221,269

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2014141180 07.11.2008

(43) Application published: **15.06.2020 Bull. № 17**(45) Date of publication: **20.11.2020 Bull. № 32**

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bolshaya Spasskaya, d. 25,
stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma
Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ZUGMAIER, Gerhard (DE)

(73) Proprietor(s):

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (DE)(54) **NEW TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; oncology.

SUBSTANCE: invention can be used for treating acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. Disclosed is the use of blinatumomab for preparing a pharmaceutical composition for treating, reducing or eliminating ALL in ALL-affected children, where said

ALL is resistant to chemotherapy or transplantation of allogeneic haemopoietic stem cells (HSCT).

EFFECT: using the invention enables achieving remission and eliminating minimal residual manifestations of ALL.

14 cl, 5 dwg, 1 tbl, 1 ex

Настоящее изобретение относится к способу лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, включающему введение фармацевтической композиции, включающей конструкцию CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, ребенку с ALL, нуждающемуся в этом.

При использовании современного лечения ALL в детском возрасте степени бессобытийной выживаемости составляют приблизительно 75%. Следовательно, все еще частым является рецидив. Проблемы в лечении рецидива ALL состоят в резистентности лейкозных клеток и снижении переносимости пациентами второго цикла лечения после того, как они уже получили интенсивную терапию первой линии, что приводит к меньшей степени ремиссии, а также большей частоте возникновения последующего рецидива и худшему исходу в целом. Таким образом, в настоящее время для вызова второй полной ремиссии весьма важна интенсифицированная поли-химиотерапия. В зависимости от ряда прогностических факторов ремиссию можно сохранять с использованием только химиотерапии и облучения головы или с использованием интенсификации лечения с помощью трансплантации стволовых клеток (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. In: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486).

Хотя был достигнут потрясающий прогресс в лечении детей с острым лимфобластным лейкозом (ALL) (смотри, например, Möricke et al., Blood 111 (2008), p. 4477; Moghrabi et al., Blood 109 (2007), p. 896), рецидивирующий ALL все еще является четвертой из наиболее распространенных злокачественных опухолей у детей (Gaynon, Cancer 82 (1998), p. 1387). Особенно в случае пациентов с ранним костномозговым рецидивом в пределах трех лет от диагностирования терапия для этих пациентов является неудовлетворительной, а трансплантация аллогенных стволовых клеток до сих пор является единственным подходом к излечению. Резистентный к химиотерапии рецидив после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) связан с неблагоприятным прогнозом, хотя инфузии лимфоцитов донора после трансплантации (DLI) могли бы вызывать ремиссии у немногочисленных пациентов через индукцию эффекта «трансплантат против лейкоза» (GvL) (Loren et al., BMT 41 (2008), p. 483). Вторая HSCT может быть необязательной, и были опубликованы данные о некоторых длительно остающихся в живых. Однако состояние заболевания перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток является предсказуемым в отношении исхода после трансплантации, и известно, что пациенты с заболеванием на морфологическом уровне или уровнями персистирующего MRD, составляющими $>10^{-4}$ лейкозных бластных клеток, подвержены очень высокому риску рецидива и имеют очень неблагоприятный исход (Bader et al., J. Clin. Oncol. 27 (2009), p. 377-84). Ввиду этого состояние заболевания перед второй HSCT имеет наибольшее значение, и должны быть предприняты все попытки для достижения другой ремиссии. Несмотря на использование недавно внедренных химиотерапевтических средств для резистентного лейкоза (Jeha, Semin Hematol. 46 (2009), 76-88), пациенты, перенесшие рецидив после HSCT, часто имеют резистентное к химиотерапии заболевание, и эти пациенты очень чувствительны к связанной с химиотерапией токсичности. В случае этих пациентов требуются не являющиеся химиотерапевтическими и с меньшей токсичностью стратегии для вызова ремиссий у таких пациентов.

Ввиду вышеотмеченных недостатков общепринятых терапий для ALL у детей, все еще имеется потребность в улучшенной схеме лечения.

Настоящее изобретение относится к способу лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, включающему введение фармацевтической композиции, содержащей конструкцию CD19×CD3-биспецифического

одноцепочечного антитела, ребенку с ALL, нуждающемуся в этом. Этот иммунологический подход с использованием задействующих Т-клетки антител впервые обуславливает не являющееся химиотерапевтическим и с меньшей токсичностью лечение ALL у детей.

Недавно в испытании фазы I на рецидивирующей CD19-позитивной В-клеточной неходжкинской лимфоме (NHL) была продемонстрирована значительная клиническая активность CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (блинатумомаба), заключающаяся в том, что наблюдалась впечатляющая частичная и полная регрессия опухолей (Bargou et al., Science 321 (2008): 974-7).

В дальнейшем, все еще проводящемся клиническом испытании лечение указанным CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом приводило к элиминации резистентных к химиотерапии лейкозных клеток у не подвергнутых трансплантации, MRD-позитивных взрослых пациентов с CD19⁺ ALL.

Теперь неожиданно установлено при двух применениях препарата у неизлечимо больных, что указанное CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело не только подходит для лечения ALL у не подвергшихся трансплантации, взрослых пациентов, но также рецидивирующего ALL у детей (или в детском возрасте), резистентного к общепринятой терапии для ALL, в том числе химиотерапии и трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

Здесь авторы настоящего изобретения сообщают о мощном противолейкозном эффекте CD19×CD3-биспецифического антитела у двух детей (в дальнейшем именуемых пациентом 1 и 2) с острым лимфобластным лейкозом (ALL) из В-клеток-предшественников, которые перенесли резистентный к химиотерапии рецидив после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) от подобранных, не являющихся родственниками и гаплоидентичных доноров.

До лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом пациента 1 подвергали предварительному лечению с использованием аллогенной HSCT и множеству химиотерапий. Однако эти общепринятые терапии для ALL у детей были несостоятельными, так что пациент повторно перенес рецидив, в результате, он имел крайне неблагоприятный прогноз. В дальнейшем ребенок с ALL получил 15 микрограмм/м²/24 ч CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела в виде непрерывной инфузии в течение пяти недель. Во время лечения антителом у пациента было отмечено размножение полученных от донора CD8⁺ Т-лимфоцитов без каких-либо признаков реакции «трансплантат против хозяина (GvHD)». Размножение этих Т-клеток было связано с быстрой элиминацией лейкозных бластных клеток пациента, и через 10 дней после начала лечения антителом в костном мозге пациента невозможно было выявить бластные клетки за пределами уровня выявления минимального остаточного заболевания (MRD), составляющего 1 клетку из 10000. Пациент оставался MRD-негативным на протяжении всего лечения антителом. Пациент подвергся второй трансплантации стволовых клеток от своей гаплоидентичной матери спустя 2 недели после окончания лечения CD19×CD3- биспецифическим одноцепочечным антителом и оставался MRD-негативным с того времени (состояние – ноябрь 2009).

У пятнадцатилетнего пациента 2 был диагностирован позитивный по филадельфийской (Ph) хромосоме и CD19 ALL из В-клеток-предшественников в апреле 2001. После химиотерапии ему были трансплантированы гемопоэтические стволовые клетки (HSCT) от идентичного по HLA (человеческому лейкоцитарному антигену) сибса в октябре 2001. В 2002 был диагностирован костномозговой рецидив, и другая ремиссия была достигнута с использованием иматиниба и химиотерапии. Затем была осуществлена

вторая HSCT от идентичного по HLA не являющегося родственником донора в октябре 2004. В марте 2008 был диагностирован второй рецидив, и его подвергли лечению химиотерапией с использованием низких доз и дасатинибом из-за резистентности к иматинибу. После дополнительной химиотерапии с использованием клофарабина и цитозина/арабинозида, он достиг ремиссии на молекулярном уровне, и была осуществлена третья аллогенная HSCT от его не совпадающего по 3 из 6 HLA-аллелей гаплоидентичного отца с лечением дасатинибом после трансплантации. Вследствие желудочно-кишечного кровотечения и дилатационной кардиомиопатии дасатиниб был отменен спустя 5 месяцев после трансплантации. В апреле 2009 был диагностирован комбинированный (сочетанный) рецидив с поражением центральной нервной системы (ЦНС), при этом было выявлено 7×10^9 /л бластных клеток в ЦНС и 3% бластных клеток в костном мозге. Затем пациента подвергли лечению нилотинибом, интратекальной химиотерапией и фракционированному облучению ЦНС с использованием 18 грей. Через три месяца после этого лечения костный мозг пациента оставался MRD-

15 позитивным на уровне $1,1 \times 10^{-3}$, в то время как ЦНС была свободна от бластных клеток. С помощью анализа химеризма периферической крови выявлен полноценный гемопоэз с происхождением от донора – его гаплоидентичного отца.

Пациента затем подвергали лечению одним средством блинатумомабом в дозе 15

20 мкг/м^2 /день в течение 4 недель посредством непрерывной инфузии без каких-либо побочных эффектов. Аспирация костного мозга в конце лечения показала полную ремиссию с не поддающимся обнаружению MRD в костном мозге на уровне, который ниже $<1 \times 10^{-4}$. Как и пациент 1, пациент 2 не демонстрировал какие-либо признаки GvHD во время или после лечения блинатумомабом. В настоящее время он посещает школу.

25 Эти данные внушительно показывают, что действующие Т-клетки биспецифические антитела могут вызвать мощный эффект «трансплантат против лейкоза» (GvL) в отсутствие GvHD у детей с резистентным к терапии и рецидивирующим ALL из В-клеток-предшественников после аллогенной HSCT. Соответственно, при описываемом здесь лечении детей предпочтительно, чтобы конструкция CD19×CD3-биспецифического

30 одноцепочечного антитела вызывала эффект «трансплантат против лейкоза» (GvL). Кроме того, лечение хорошо переносится детьми. Ввиду этого средства и способы по настоящему изобретению обуславливают на удивление улучшенный вариант лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, особенно в тех случаях, когда ALL у детей является резистентным к общепринятой терапии для ALL у детей, в том числе,

35 химиотерапии и/или аллогенной HSCT. Соответственно, и в дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения, используемые здесь конструкции действующих Т-клетки биспецифических антител (против CD19×CD3) можно также использовать в случае детей, подвергшихся трансплантации (аллогенных)

40 гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Как здесь проиллюстрировано, даже детей, перенесших рецидив ALL после HSCT от подобранного, не являющегося родственником или гаплоидентичного донора, и/или детей, которые были резистентными к химиотерапии, можно с успехом лечить с использованием средств и способов, описываемых в настоящем документе. Приводимые в качестве примеров пациенты, как здесь документируется, продемонстрировали впечатляющую противолейкозную

45 реакцию при фармацевтическом воздействии, описываемом здесь, и стали MRD-негативными в отсутствие каких-либо признаков GvHD. Хотя выживание детей с ALL увеличилось существенно в течение последних десятилетий, рецидивирующий ALL все еще остается основной причиной несостоятельности лечения. В случае пациентов со

вторым рецидивом аллогенная HSCT до сих пор является единственным подходом к излечению. Одним из основных противолейкозных действий HSCT является вызов эффекта GvL. К сожалению, возникновение GvL часто сопровождается GvHD, которая до сих пор является основной причиной осложнения и смертности после HSCT. Поэтому вызов эффекта GvL в отсутствие реакции GvHD является предметом интенсивного исследования. Одним из подходов к вызову эффекта GvL являются инфузии лимфоцитов донора (DLI) после трансплантации, которые предпочтительно используются для лечения рецидивирующего ALL после HSCT. Хотя DLI является очень эффективной при лечении хронического миелолейкоза (CML) (Kolb, Blood 76 (1990), 2462), она менее эффективна при посттрансплантационном лечении рецидивирующего ALL (Loren, BMT 41 (2008), 483) и часто приводит к возникновению реакции GvHD.

Фармацевтические и лекарственные методы и средства по настоящему изобретению обуславливают новый подход к вызову эффекта GvL без реакции GvHD. Этим подходом является *in vivo* активация полученных от донора лимфоцитов после HSCT, используя низкие дозы задействующего Т-клетки CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, которое направляет Т-лимфоциты против CD19+ бластных клеток ALL пациента. Это антитело продемонстрировало впечатляющую активность против лимфомы и лейкоза в ситуации аутологичной трансплантации, но никогда не проверялось при рецидивирующем ALL у детей после HSCT. Два ребенка, описываемых в следующих примерах, перенесли рецидив ALL после HSCT от подобранного, не являющегося родственником или гаплоидентичного донора и были резистентны к химиотерапии. Пациенты продемонстрировали впечатляющую противолейкозную реакцию после инициации лечения и стали MRD-негативными в отсутствие каких-либо признаков реакции GvHD. Иммунологическое действие CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела не зависит от презентации пептидного антигена, и это, наиболее вероятно, является причиной того, что, несмотря на широкомасштабное *in vivo* размножение полученных от донора Т-клеток, реакция GvHD не вызывалась. Низкие дозы CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антител были достаточны для элиминации бластных клеток ALL у пациентов до уровней, находящихся за пределами уровней выявления MRD. Таким образом, механизм действия этого антитела через привлечение Т-клеток очень отличается от обычных антител, в случае которых требуются намного более высокие дозы и которые не могут задействовать Т-клетки через посредство их Fc-части молекулы антитела из-за отсутствия рецепторов для Fc на Т-клетках. Через посредство CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела высокоэффективные Т-клетки-эффекторы могут стать цитотоксическими по отношению к бластным клеткам ALL без вызова аллоиммунного ответа, приводящего к реакции GvHD. Авторы настоящего изобретения решили выполнить вторую аллогенную HSCT от гаплоидентичного донора пациенту 1 после того, как он стал MRD-негативным. До сих пор (ноябрь 2009), этот пациент является все еще MRD-негативным.

На основе первоначального клинического опыта на этих двух пациентах с резистентным к химиотерапии рецидивом ALL после трансплантации был сделан вывод, что CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело может вызвать впечатляющие полные ремиссии без реакции GvHD. Следовательно, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом в предтрансплантационной ситуации для иммунологического уменьшения массы лейкозных клеток и для лечения рецидивов после трансплантации обеспечивает новые возможности лечения детей с запущенным ALL.

Способ настоящего изобретения обуславливает следующие основные преимущества:

1. Как показано в следующих примерах, введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела может использоваться для лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, который является рецидивирующим и/или резистентным.

CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело может не только заместить
 5 общепринятые терапии для острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей (такие как химиотерапия) для детей, не подходящих для трансплантации аллогенных стволовых клеток. Оно может также использоваться для перевода состояния детей с ALL, подходящих для указанной трансплантации, в MRD-негативное состояние. Этот аспект
 10 настоящего изобретения важен тем, что MRD-негативные пациенты подвержены меньшему риску рецидива после трансплантации, чем MRD-позитивные пациенты. В лучшем варианте развития событий лечение ALL у детей с использованием CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела делает ненужной химиотерапию и/или HSCT.

2. Известно, что дети с заболеванием на морфологическом уровне или уровнями
 15 персистирующего MRD, составляющими $>10^{-4}$ лейкозных бластных клеток, подвержены очень высокому риску рецидива и имеют очень неблагоприятный исход (Bader et al., J. Clin. Oncol. 27 (2009), p. 377-84). Подвергнутые лечению CD19×CD3-биспецифическим
 20 одноцепочечным антителом дети продемонстрировали впечатляющую противолейкозную реакцию после инициации лечения и стали MRD-негативными во время лечения, в отсутствие каких-либо признаков реакции GvHD. Следовательно, фармацевтические способы и средства по настоящему изобретению обеспечивают
 25 терапевтический подход к лечению, уменьшению интенсивности или устранению MRD при ALL у детей, уменьшая или даже устраняя, тем самым, риск рецидива для пациента. Лечебный потенциал аллогенной HSCT зависит от уровня MRD перед трансплантацией. Лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом может использоваться
 30 для перевода состояния указанных детей, подверженных высокому риску, в MRD-негативное состояние. Следовательно, MRD при резистентном ALL у детей можно впервые лечить с помощью CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела.

3. Фармацевтические способы и средства по настоящему изобретению не только
 35 демонстрируют мощный противолейкозный эффект, но они также обладают меньшей токсичностью и вызывают меньше неблагоприятных действий, чем общепринятые терапии для ALL у детей, включающие химиотерапию и/или аллогенную HSCT. До сих пор не наблюдались длительные побочные эффекты после лечения CD19×CD3-
 40 биспецифическим одноцепочечным антителом. Напротив, традиционные терапии для ALL у детей являются очень интенсивными и поэтому связаны со значительными рисками для здоровья детей. Кроме того, опубликованы данные о поздних эффектах после общепринятой терапии для ALL в детском возрасте (смотри, например, Hudson MM, Late complications after leukemia therapy. In: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 750-773; Schmoll, Höffken, Possinger: Kompendium
 45 Internistische Onkologie, S. 2660 ff.; 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg; <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/lateeffects/HealthProfessional>). На самом деле, при общепринятых лечениях ALL у детей используются даже более интенсивные схемы лечения, чем при терапевтических подходах, которые используются для ALL у взрослых. Однако, что очевидно из составляющей приблизительно 25% степени рецидивов при
 ALL у детей, даже эти интенсивные терапии не являются достаточными для излечения в итоге всех пациентов. Ввиду этого даже более неожиданным является то, что лечение детей с резистентным и/или рецидивирующим ALL CD19×CD3-биспецифическим
 одноцепочечным антителом способно к переводу указанных пациентов в MRD-

негативное состояние, что обеспечивает новые возможности лечения таких пациентов, подверженных высокому риску. Это является результатом, который не мог бы быть достигнут при использовании общепринятой терапии для ALL у детей, такой как химиотерапия и/или HSCT.

5 4. Например, очень высокому риску рецидива подвержены дети с Ph+ ALL (bcr/abl) среди всех пациентов в пределах подтипов лейкоза (смотри ниже). Хотя в настоящее время считается, что аллогенная HSCT является предпочтительным лечением при Ph+ ALL у детей, приблизительно одна треть подвергшихся трансплантации пациентов переносит рецидив. Кроме того, как изложено подробнее ниже, младенцы (<12 месяцев)
10 с ALL подвержены большему риску несостоятельности общепринятого или стандартного лечения ALL, с самым неблагоприятным прогнозом для младенцев с реаранжировками генов MLL (t(4;11)). Эти результаты, отмеченные в случае пациента 2 в следующих примерах, и данные, полученные в вышеотмеченном проводящемся клиническом испытании, в котором осуществляется лечение взрослых (не подвергнутых
15 трансплантации) пациентов с ALL, говорят о том, что даже Ph+ ALL (bcr/abl) и ALL с реаранжировками генов MLL можно с успехом лечить с помощью введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела. Следовательно, введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела обеспечивает новый подход к лечению Ph+ ALL или ALL с транслокациями t(4;11) у детей, особенно в случае детей, страдающих
20 ALL, с минимальным остаточным заболеванием (MRD). Это с учетом минимального остаточного заболевания (MRD), определяемого с помощью, например, анализа с использованием ПЦР (PCR) или FACS (клеточного сортера с возбуждением флуоресценции).

5 5. Из-за очень высокой цитотоксической активности необходимы исключительно низкие дозы CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела для успешного
25 лечения ALL у детей, что позволяет элиминировать лейкозные клетки даже в костном мозге.

6. Более короткая продолжительность лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом по сравнению с общепринятой терапией для ALL у детей.
30 Общепринятая химиотерапия для ALL у детей занимает обычно 2-3 года, тогда как у детей, продемонстрированных в следующих примерах, можно было наблюдать быструю ответную реакцию на CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело. Более того, ответная реакция является продолжительной: пациент 1 оставался MRD-негативными в течение более 12 месяцев после трансплантации; смотри следующие
35 примеры.

7. Дети с рецидивирующим ALL часто имеют резистентное к химиотерапии заболевание, и эти пациенты очень чувствительны к связанной с химиотерапией токсичности. В случае этих пациентов лечение CD19×CD3-биспецифическим
40 одноцепочечным антителом впервые обеспечивает стратегию, не являющуюся химиотерапевтической и с меньшей токсичностью, для вызова ремиссии у таких пациентов.

8. Как установлено в описываемом выше проводящемся клиническом испытании на ALL у взрослых пациентов, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом приводило к элиминации резистентных к химиотерапии лейкозных клеток
45 у не подвергавшихся трансплантации, MRD-позитивных по показателю минимального остаточного заболевания взрослых пациентов с CD19+ ALL. Тогда как у этих пациентов задействованные цитотоксические Т-клетки происходили от пациента, до сих пор не существовало данных об использовании CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного

антитела после аллогенной HSCT в ситуации, когда задействованные Т-клетки получены от донора. Здесь авторы настоящего изобретения впервые сообщают о мощном вызове эффекта GvL в отсутствие GvHD, который был вызван CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом, действующим на полученные от донора Т-клетки, у двух

детей с резистентным к химиотерапии рецидивом CD19+ ALL после аллогенной HSCT. В заключение, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом обуславливает новую и улучшенную терапию для ALL у детей, особенно для резистентного и/или рецидивирующего ALL у детей.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению острым лимфобластным лейкозом (ALL) у детей или в детском возрасте является ALL из клеток В-линии у детей, предпочтительно острый лимфобластный лейкоз (ALL) из В-клеток-предшественников у детей, более предпочтительно про-В-клеточный ALL, пре-В-клеточный ALL или общий В-клеточный ALL (сALL) у детей. Даже предпочтительнее ALL из В-клеток-предшественников у

детей является общий В-клеточный ALL (сALL). Подавляющее большинство случаев (>85%) ALL у детей или в детском возрасте является ALL с фенотипом В-клеток-предшественников (Schultz et al., Blood 109 (2007): 926-935). Поскольку CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело, описываемое здесь, направлено против связанного с В клетками маркера CD19,

указанное антитело особенно подходит в качестве терапевтического средства для острого лимфобластного лейкоза из клеток В-линии у детей, более предпочтительно для ALL из В-клеток-предшественников у детей. ALL из В-клеток-предшественников у детей можно далее подразделить на про-В-клеточный ALL, пре-В-клеточный ALL и общий В-клеточный ALL (сALL) у детей (смотри, например, Behm F. G.,

Immunophenotyping. In: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209). Обзор острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, в том числе острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников у детей и других типов ALL из клеток В-линии у детей, и их лечений приведен, например, в Pui CH, Clin. Adv. Hematol. Oncol. 4 (2006): 884-846; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH et al., Lancet 371 (2008): 1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165). Дополнительную информацию в отношении ALL у детей можно также найти, например, на сайте <http://www.cancer.gov> или <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

С исторической точки зрения, группы Pediatric Oncology Group (POG) и Children's Cancer Group (CCG) приняли на международной конференции общую совокупность критериев риска, которая была поддержана Национальным институтом рака (NCI) (Smith M, et al., J. Clin. Oncol. 14 (1996), 18-24), в 1993. Критерии, определенные NCI, основывались на факторах, которые получили международное одобрение и имели повторяемость: возрасте, исходных уровнях лейкоцитов (WBC) и наличии экстрамедуллярной опухоли при диагностировании. Для дальнейшего улучшения терапии обе группы POG и CCG также использовали дополнительные факторы риска, которые, как было установлено, оказывают влияние на исходы у пациентов (например, плоидность, кариотип бластных клеток и раннюю ответную реакцию на морфологическом уровне). В 2000 произошло объединение групп CCG и POG с образованием Children's Oncology Group (COG). Это объединение позволило проанализировать клинические, биологические данные и данные о ранних ответных реакциях, предсказывающие бессобытийную выживаемость (EFS) при остром лимфобластном лейкозе (ALL), для разработки новой классификационной системы и предписания лечения. Из 11779 детей (возрастом от 1 до 21,99 лет) с недавно

диагностированным ALL из В-клеток-предшественников, последовательно зарегистрированных CCG-группой (с декабря 1988 по август 1995, n=4986) и POG-группой (с января 1986 по ноябрь 1999, n=6793), в исследовании присущих некоторой группе людей признаков, связанных с развитием у них какого-либо заболевания в прошлом, было проанализировано 6238 пациентов (CCG, 1182; POG, 5056) с использованием информативных цитогенетических данных (Schultz et al., Blood 109 (2007): 926-935). Четыре группы риска были определены как очень высокий риск (VHR; EFS в течение 5 лет составляет 45% или меньше), более низкий риск (EFS в течение 5 лет составляет по крайней мере 85%) и обычный и высокий риск (остающиеся в соответствующих группах риска, определенных Национальным институтом рака [NCI]). Критерии VHR включали гиподиплоидию крайней степени (менее 44 хромосом), t(9; 22) и/или BCR/ABL, и недостаточность вызова ремиссии. Пациенты, подверженные более низкому риску, были подвержены обычному в соответствии с NCI риску, при этом имея либо t(12;21) (TEL/AML1), либо одновременные трисомии хромосом 4, 10 и 17. Даже при том, что существовали различия в лечении, существовало большое соответствие между анализами групп CCG и POG. Система классификации рисков COG используется для деления ALL из В-клеток-предшественников на группы низкого риска (27%), обычного риска (32%), высокого риска (37%) и очень высокого риска (4%) на основе возраста, уровня лейкоцитов (WBC), цитогенетики, ответной реакции костного мозга в день 14 и минимального остаточного заболевания (MRD) при последнем вызове ремиссии, определяемого с помощью проточной цитометрии, в испытаниях COG.

В настоящее время назначение лечения на основе риска используется для острого лимфобластного лейкоза (ALL) в детском возрасте или у детей. Этот подход делает возможным лечение детей, которые вначале имеют благоприятный исход, с использованием умеренной терапии и избавление их от более интенсивного и обладающего токсичностью лечения, при этом делая возможным получение детьми с более низкой вначале вероятностью длительного выживания более интенсивной терапии, которая может увеличить их шанс на излечение. Было установлено, что дети старшего возраста и подростки (≥ 10 лет) и младенцы (< 12 месяцев) имеют менее благоприятный исход, чем дети возрастом от 1 до 9 лет в момент диагностирования, и для этих пациентов обычно используются более интенсивные лечения (Nachman J, Br J Haematol 130 (2005): 166-173). Лечение CD19 $\times$ CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом обеспечивает теперь улучшенную терапию с меньшей токсичностью для таких популяций детей, т.е. детей старшего возраста и подростков (≥ 10 лет) и младенцев (< 12 месяцев), имеющих менее благоприятные исходы при использовании общепринятой терапии для ALL, такой как химиотерапия и/или HSCT.

Для успешного лечения детей с ALL требуется контроль системного заболевания (например, костного мозга, печени и селезенки, лимфатических узлов), а также предупреждение или лечение экстрамедуллярной опухоли, особенно в центральной нервной системе (ЦНС). Только 3% пациентов имеют поддающееся обнаружению с использованием общепринятых критериев в момент диагностирования вовлечение в патологический процесс ЦНС (≥ 5 WBC/микролитр с присутствием лимфобластов). Однако если специфическая терапия не направлена на ЦНС, у от 50% до 70% или более детей, в конце концов, разовьется лейкоз с выраженным распространением на ЦНС. Поэтому в настоящее время рекомендуется обязательное назначение всем детям с ALL системной комбинированной химиотерапии вместе с некоторой формой профилактики в отношении ЦНС. В настоящее время большинство коллективов лечат пациентов с лейкозом с документированным при диагностировании распространением на ЦНС (> 5

WBC/мкл с бластными клетками; CNS3) и пациентов с ALL с Т-клеточным фенотипом и высоким WBC при диагностировании с использованием интратекальной терапии и последующего облучения головы. Соответственно, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом предпочтительно проводят в комбинации с профилактикой

в отношении ЦНС, такой как интратекальная терапия и/или облучение головы.

Общепринятое или стандартное лечение детей с ALL подразделяется на две стадии: вызов ремиссии, консолидация или интенсификация, и поддерживающая (или продолжающаяся) терапия, при этом на каждой стадии обычно предоставляется терапия для профилактики в отношении ЦНС. Для всех пациентов используется этап интенсификации терапии, следующий за вызовом ремиссии. Интенсивность как терапии для вызова ремиссии, так и терапии после вызова ремиссии определяют по клиническим и биологическим прогностическим факторам, используемым для назначения лечения на основе риска, и некоему типу оценки ранней ответной реакции. Эта оценка может включать процентное содержание бластных клеток в костном мозге в день 7 и/или день 14, уровень бластных клеток в периферической крови в день 8 и определения минимального остаточного заболевания в костном мозге и/или периферической крови во время или в конце вызова ремиссии (Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178). Продолжительность терапии для детей с ALL колеблется между 2 и 3 годами. Напротив, очень быструю ответную реакцию на лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом можно было наблюдать у детей, как показано в следующих примерах. Кроме того, пациент 1 является MRD-негативным до настоящего времени (ноября 2009), что означает, что может быть достигнуто длительное излечение.

Для подгрупп пациентов, которые имеют неблагоприятный прогноз при использовании современной стандартной или общепринятой терапии, может потребоваться отличное лечение. Например, младенцы с ALL подвержены большему риску несостоятельности лечения, при этом самый неблагоприятный прогноз имеют младенцы с реаранжировками генов MLL (Rubnitz JE, et al.: Blood 84 (1994): 570-573; Biondi A, et al., Blood 96 (2000): 24-33; Pui CH, et al., Lancet 359 (2002): 1909-1915; Silverman LB, et al.: Cancer 80 (1997): 2285-2295). Этих детей обычно подвергают лечению с использованием схем, специально разработанных для младенцев (Silverman, et al., (1997), в процитированном месте, Chessells JM, et al., J. Haematol 117 (2002): 306-314; Reaman GH, et al., J. Clin. Oncol. 17 (1999): 445-455; Pieters R, et al., Lancet 370 (2007): 240-50). В современных схемах для младенцев используются интенсифицированные подходы для лечения, и они могут обеспечить улучшенный контроль заболевания по сравнению с предшествующими менее интенсивными подходами, но не известны долгосрочные результаты и токсичность (Reaman (1999), в процитированном месте; Pieters (2007), в процитированном месте; Kosaka Y, et al., Blood 104 (2004): 3527-3534; Hilden JM, et al., Blood 108 (2006): 441-451). Некоторые дети (старше 1 года) с ALL (например, пациенты с t[9;22] Ph+ ALL, с гиподиплоидией, и пациенты с первоначальной недостаточностью вызова ремиссии, возможно, могут иметь составляющую менее 50% вероятность длительной ремиссии при использовании современной терапии. В случае этих пациентов во время первой ремиссии рассматривается трансплантация аллогенного костного мозга от совпадающего по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA) sibса (Snyder DS, et al., Leukemia 13 (1999): 2053-2058; Arico M, et al., N Engl J Med 342 (2000): 998-1006; Schrauder A, et al., J Clin Oncol 24 (2006): 5742-5749). Однако не доказано, что трансплантат от совпадающего по HLA sibса-донора помогает пациентам, определенным как пациенты, подверженные высокому риску, только по уровню WBC, анатомическому полу и возрасту (Ribera JM, et al., J Clin Oncol 25 (2007): 16-24).

Поскольку миелосупрессия и генерализованная иммуносупрессия являются ожидаемыми последствиями и лейкоза, и его лечения с использованием химиотерапии, пациентов необходимо всесторонне контролировать во время общепринятого лечения ALL у детей. Соответствующие устройства должны находиться в готовности к
 5 немедленному использованию как для гематологической помощи, так для лечения инфекций и других осложнений на протяжении всех этапов лечения лейкоза. Приблизительно 1% пациентов умирают во время терапии для вызова ремиссии, а еще 1%-3% умирают во время первой ремиссии от связанных с лечением осложнений (Christensen MS et al., Br J Haematol 131 (2005): 50-58).

10 Лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом обуславливает альтернативную и обладающую меньшей токсичностью терапию для ALL у детей, особенно для резистентного и/или рецидивирующего ALL у детей. При указанном лечении устраняются недостатки общепринятых терапий для ALL в детском возрасте, такие как несостоятельность лечения, токсичность и длительные неблагоприятные
 15 воздействия. Следовательно, оно является высокоэффективным, но с меньшей токсичностью и является альтернативой риску для здоровья – химиотерапии и/или аллогенной HSCT.

Соответственно, в другом варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению указанным острым лимфобластным лейкозом
 20 (ALL) является резистентный и/или рецидивирующий ALL.

ALL у детей может быть резистентным к химиотерапии или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) или к химиотерапии и трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). ALL может быть рецидивирующим ALL или рецидивирующим ALL, резистентным к общепринятой
 25 терапии для ALL, включающей химиотерапию и/или трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Однако в пределах объема настоящего изобретения находится то, что ALL является недавно диагностированным ALL. В этой ситуации лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом может использоваться в качестве первой терапии (первой линии), либо отдельно, либо в
 30 комбинации с HSCT.

Термин «резистентный ALL у детей» подразумевает резистентность ALL у детей к общепринятой или стандартной терапии для ALL у детей, такой как химиотерапия и/или HSCT. В настоящее время степень рецидивов при ALL у детей составляет
 35 приблизительно 25%. Иначе говоря, общепринятая или стандартная терапия для ALL у детей не может привести в итоге к излечению всех детей.

Термин «рецидивирующий ALL у детей» обозначает возвращение признаков и симптомов заболевания ALL после того, как ребенок имел ремиссию. Например, после общепринятого лечения ALL, используя химиотерапию и/или HSCT, ребенок с ALL может войти в ремиссию без признаков или симптомов ALL, имеет ремиссию в течение
 40 двух лет, но затем переносит рецидив и должен вновь подвергнуться лечению в отношении ALL.

Дети с ALL с рецидивом часто имеют резистентное к химиотерапии заболевание. Эти пациенты очень чувствительны к связанной с химиотерапией токсичности, которую можно избежать при лечении CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом.

45 Термин «стандартная терапия» или «общепринятая терапия» относится к терапии для ALL у детей, используя химиотерапию и/или HSCT. Обзор острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, в том числе, острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников у детей и других типов ALL из клеток В-линии у детей, и их лечений

приведен, например, в Pui CH, Clin. Adv. Hematol. Oncol. 4 (2006): 884-8846; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH et al., Lancet 371 (2008): 1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165; Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. In: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486). Дополнительную информацию в отношении ALL у детей можно также найти, например, на сайте <http://www.cancer.gov> или <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

Термин «биспецифическое одноцепочечное антитело» или «одноцепочечное биспецифическое антитело» или родственные термины в соответствии с настоящим изобретением означает конструкции антител, являющиеся следствием соединения по крайней мере двух переменных областей антител в одну полипептидную цепь, свободную от константных областей и/или Fc-части(ей), присутствующих в полноразмерных иммуноглобулинах. Упомянутое здесь биспецифическое одноцепочечное антитело является функциональным, т.е. цитотоксически активным, в виде мономера, а поэтому является, безусловно, отличимым от диател или tandAb, описанных в данной области техники, которые являются функциональными только в виде димеров или мультимеров. «Линкер», как здесь используется, соединяет V-домены одной и той же специфичности, тогда как «спейсер», как здесь используется, соединяет V-домены различных специфичностей. Например, биспецифическое одноцепочечное антитело может быть конструкцией, в которой использованы всего две переменные области антител, например, две VH-области, каждая из которых способна к специфическому связыванию особого антигена, и которые соединены друг с другом через короткий (обычно менее 10 аминокислот) синтетический полипептидный спейсер из условия, чтобы две переменные области антител со вставленным между ними спейсером существовали в виде одной непрерывной полипептидной цепи. Другим примером биспецифического одноцепочечного антитела может быть единственная полипептидная цепь с тремя переменными областями антител. В этом случае две переменные области антител, например одна VH и одна VL, могут составлять scFv, в котором две переменные области антител соединены друг с другом через синтетический полипептидный линкер, при этом линкер часто генетически конструируют так, чтобы он был в минимальной степени иммуногенным при сохранении максимальной устойчивости к протеолизу. Этот scFv способен к специфическому связыванию с конкретным антигеном и соединен с дополнительной переменной областью антитела, например VH-областью, способной к связыванию с антигеном, отличным от того, который связывается scFv. Еще одним примером биспецифического одноцепочечного антитела может быть единственная полипептидная цепь с четырьмя переменными областями антител. В этом случае первые две переменные области антител, например VH-область и VL-область, могут образовывать один scFv, способный к связыванию с одним антигеном, тогда как вторые две переменные области: VH и VL – могут образовывать второй scFv, способный к связыванию с другим антигеном. В пределах одной непрерывной полипептидной цепи отдельные переменные области антител одной специфичности могут быть преимущественно разделены синтетическим полипептидным линкером, описываемым выше, тогда как соответствующие scFv могут быть преимущественно разделены коротким полипептидным спейсером, описываемым выше. Не ограничивающие примеры биспецифических одноцепочечных антител, а также способов их получения представлены в WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025; Kufer, Cancer Immunol. Immunother, (1997), 45, 193-197; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103;

Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

«CD3» обозначает антиген, который экспрессируется на Т-клетках, предпочтительно Т-клетках человека в виде части многомолекулярного рецепторного комплекса Т-клеток, при этом CD3 состоит из пяти различных цепей: CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эта и CD3-зета. Агрегация CD3 на Т-клетках, например, антителами против CD3 приводит к активации Т-клеток, схожей с таковой при связывании антигена, но не зависящей от клональной специфичности субпопуляции Т-клеток. Таким образом, термин «CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело» относится к CD3-специфической конструкции, способной к связыванию с включающим CD3 человека комплексом, экспрессируемым на Т-клетках человека, и способной к индукции элиминации/лизиса клеток-мишеней, причем такие клетки-мишени несут/представляют антиген, который связывается другой частью, не являющейся CD3-связывающей частью, биспецифического одноцепочечного антитела. Связывание включающего CD3 комплекса CD3-специфическими связующими веществами (например, биспецифическим одноцепочечным антителом, вводимым в соответствии с фармацевтическими средствами и способами настоящего изобретения) приводит к активации Т-клеток, как известно в данной области техники; смотри, например, WO 99/54440 или WO 2007/068354. Соответственно, подходящая для фармацевтических средств и способов настоящего изобретения конструкция предпочтительно способна к элиминации/лизису клеток-мишеней *in vivo* и/или *in vitro*. Соответствующие клетки-мишени включают клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как CD19, который распознается второй специфичностью (т.е. частью, не являющейся CD3-связывающей частью, биспецифического одноцепочечного антитела) указанной конструкции. Предпочтительно указанной второй специфичностью является специфичность в отношении CD19 человека, который уже был описан в WO 99/54440, WO 2004/106381 или WO 2007/068354. В соответствии с этим вариантом осуществления каждая антигенспецифическая часть биспецифического одноцепочечного антитела включает VH-область антитела и VL-область антитела. Преимущественным вариантом этого биспецифического одноцепочечного антитела является следующий вариант в направлении от N-конца к С-концу:

$V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$.

В значении настоящего изобретения под термином «специфически связывающийся» или родственными терминами, такими как «специфичность», должно подразумеваться характеризующийся, главным образом, двумя параметрами: качественным параметром (эпитопом связывания, или *где* антитело связывается) и количественным параметром (аффинностью связывания, или *насколько сильно* это антитело связывается там, где оно связывается). Какой эпитоп связывается антителом, можно преимущественно определить, например, с помощью методики с использованием FACS, ELISA, картирования эпитопов с использованием пептидных районов или масс-спектропии. Силу связывания антитела с конкретным эпитопом можно преимущественно определить, например, с помощью известных методик Biacore и/или ELISA. Комбинация таких методов позволяет рассчитать отношение сигнал:шум в качестве репрезентативного показателя специфичности связывания. В таком отношении сигнал:шум сигнал представляет силу связывания антитела с представляющим интерес эпитопом, тогда как шум представляет силу связывания антитела с другими, неродственными эпитопами, отличными от представляющего интерес эпитопа. Отношение сигнал:шум, составляющее, например, по крайней мере 50, но предпочтительно приблизительно 80, для соответствующего эпитопа, представляющего интерес, определенное, например,

с помощью Biacore, ELISA или FACS, может быть принято в качестве индикатора того, что оцениваемое антитело связывается с представляющим интерес эпитопом специфическим образом, т.е. оно является «специфическим связующим веществом».

Термин «связывающийся с/взаимодействующий с» может также относиться к конформационному эпитопу, структурному эпитопу или детерминанте прерывистого типа, состоящей из двух или даже более районов молекул-мишеней человека или их частей. Конформационный эпитоп задается двумя или более дискретными аминокислотными последовательностями, разделенными в первичной последовательности, которые сближаются на поверхности молекулы при укладке полипептида во встречающийся в природе белок (Sela, (1969) Science 166, 1365 и Laver, (1990) Cell 61, 553-556). Термин «детерминанта прерывистого типа» означает нелинейные эпитопы, которые собираются из остатков из находящихся на расстоянии частей полипептидной цепи. Эти остатки сближаются на поверхности молекулы при укладке полипептидной цепи в трехмерную структуру с созданием конформационного/структурного эпитопа.

В самом широком значении термин «лечение» означает медицинские процедуры или применения, которые предназначены для ослабления заболевания. В случае настоящего изобретения введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (приготовленного для введения ребенку с ALL), описываемого здесь, осуществляется для лечения, уменьшения интенсивности или устранения заболевания ALL у детей.

Термин «уменьшение интенсивности» является синонимом термина «улучшение». Если в состоянии ребенка с ALL демонстрируется улучшение, пациенту очевидно лучше – существует некоторое улучшение ее или его клинического состояния. Например, в состоянии пациента с ALL может быть улучшение, если можно достичь стабилизации заболевания ALL, т.е. заболевание ALL больше не является прогрессирующим. Эта стадия заболевания также называется стабильным заболеванием. Уменьшением интенсивности может также быть улучшение состояния MRD у ребенка с ALL. Например, до начала лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом у ребенка с ALL можно определить 100 лейкозных клеток на 10^4 клеток костного мозга. Благодаря лечению CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом число лейкозных клеток может быть уменьшено до 10 лейкозных клеток или даже меньшего числа лейкозных клеток (например, меньше одной лейкозной клетки) на 10^4 клеток костного мозга в этом приводимом в качестве примера случае.

Термин «устранение (элиминация)» означает удаление лейкозных клеток из организма ребенка с ALL. Как показано в следующих примерах, введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела способно к переводу MRD-позитивного острого лимфобластного лейкоза (ALL) в MRD-негативное состояние, т.е. в состояние, при котором MRD не выявляется ($<10^{-4}$, т.е. меньше 1 лейкозной клетки на 10^4 клеток костного мозга, поддающихся обнаружению). В этом случае достигается полная ремиссия на молекулярном уровне.

Термин «введение» означает введение терапевтически эффективной дозы вышеотмеченного CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (предпочтительно антитела, показанного в SEQ ID NO: 1) индивидууму, т.е. являющемуся человеком ребенку. Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается доза, которая вызывает эффекты, ради которых она вводится, т.е. достаточная для уничтожения клеток острого лимфобластного лейкоза. Предпочтительно введенная доза CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела приводит к элиминации

всех клеток острого лимфобластного лейкоза из организма ребенка, что дает в результате MRD-негативное состояние ALL, определенное здесь. Точная доза будет зависеть от цели лечения, и ее сможет определить квалифицированный в данной области техники специалист, используя известные методы. Штатный врач и клинические факторы

5 будут определять схему дозирования. Как это хорошо известно в области медицины, дозы для какого-либо одного ребенка зависят от множества факторов, включающих размер, площадь поверхности тела, возраст, вес тела ребенка, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно.

10 Типичная доза может, например, находиться в диапазонах, изложенных в вариантах осуществления способов и средств по настоящему изобретению и прилагаемых примерах; однако предусматриваются дозы, которые ниже или выше этого приводимого в качестве примера диапазона, особенно принимая во внимание вышеотмеченные факторы.

Термин «непрерывная инфузия» относится к инфузии, дозволенной к осуществлению

15 постоянно в течение периода времени, т.е. без перерыва. «Непрерывная инфузия» относится к постоянно проводимой инфузии. Соответственно, в контексте настоящего изобретения термины «постоянная» и «непрерывная» используются в качестве синонимов. В значении настоящего изобретения, например, термин «вводимое с помощью непрерывной инфузии в течение (по крайней мере) 4 недель» или т.п.

20 обозначает(ют) ситуацию, в которой CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело, используемое в фармацевтических средствах и способах в соответствии с настоящим изобретением, вводят непрерывно в организм ребенка в течение периода, составляющего (по крайней мере) 4 недели, непрерывным, постоянным образом на протяжении всего срока, требуемого в фармацевтических средствах и способах

25 настоящего изобретения. Схемы непрерывного введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела описаны подробнее в WO 2007/068354. Избегают перерыва во введении CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, т.е. не имеет место, или в значительной степени не имеет место, переход от ситуации, в котором антитело вводят в организм ребенка, к ситуации, в которой это антитело дольше не

30 вводят в организм ребенка, в течение всего срока введения, который требуют фармацевтические средства и способы настоящего изобретения, по причинам, отличным от пополнения запаса вводимого CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела или медицинских вмешательств, которые стали необходимыми, и т.п. Поскольку такое необходимое пополнение приводит к временному перерыву во введении вводимого

35 антитела, такое введение все еще должно считаться «непрерываемым» или «постоянным» в значении фармацевтических средств и способов в соответствии с настоящим изобретением. В большинстве случаев обычно продолжительность такого пополнения будет настолько короткой, что время, в течение которого антитело не вводится в организм ребенка, будет исчезающее малым по сравнению со временем, планируемым

40 для всей схемы введения в соответствии с фармацевтическими средствами и способами в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с настоящим изобретением под одним циклом введения может подразумеваться непрерывная инфузия CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела пациенту с ALL в течение периода, составляющего (по крайней мере) 4 недели, с последующим 2-недельным промежутком

времени без лечения. Используемый здесь термин «по крайней мере» означает, что непрерывная инфузия может также выполняться в течение периода времени, превышающего 4 недели, например, в течение 5, 6, 7 или 8 недель или даже дольше, с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения. Не исключено, что

45 времени без лечения. Используемый здесь термин «по крайней мере» означает, что непрерывная инфузия может также выполняться в течение периода времени, превышающего 4 недели, например, в течение 5, 6, 7 или 8 недель или даже дольше, с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения. Не исключено, что

после определения стадии MRD у подвергнутого лечению ребенка(детей) после непрерывного введения в течение (по крайней мере) 4 недель (или одного цикла лечения) может быть достигнута минимальная или частичная ответная реакция, а не MRD-негативность. В таких случаях непрерывное введение может быть продолжено на
 5 дополнительный один, два, три, четыре, пять или даже вплоть до десяти циклов лечения для достижения лучшего терапевтического результата, например, полной гематологической ответной реакции, или даже полной ответной реакции на молекулярном уровне. Предпочтительно указанная полная ответная реакция на молекулярном уровне является MRD-негативностью (определяемой ниже), которая
 10 уменьшает риск рецидива заболевания ALL. Например, установлено, что MRD-негативность или низкие уровни MRD у детей с ALL до аллогенной HSCT уменьшает риск рецидива (Bader P, et al., J Clin Oncol 27 (2009): 377-384). Как показано в следующих примерах, MRD-негативность может быть достигнута посредством лечения детей с ALL CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом.

Поэтому в одном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению аллогенная HSCT следует за одним или более циклами, в которых CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело непрерывно вводят ребенку с ALL. Иначе говоря, в этом предпочтительном варианте осуществления способ
 15 настоящего изобретения осуществляют до трансплантации аллогенных стволовых клеток (HSCT) для перевода MRD-позитивного ALL в MRD-негативное состояние. Таким образом, риск рецидива значительно уменьшается.

В другом варианте осуществления способа настоящего изобретения способ осуществляют после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

За проведением трансплантации может следовать один цикл или более циклов лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом. Этот вариант осуществления важен в случаях рецидивирующего ALL у детей, которые были подвергнуты
 25 химиотерапии и HSCT. Из-за несостоятельности этих общепринятых терапий заболевание может рецидивировать и теперь подвергаться лечению посредством введения указанного антитела. Кроме того, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом
 30 может использоваться в качестве консолидации ремиссии после HSCT во избежание другого рецидива заболевания ALL.

В следующих примерах предоставлены также данные по применению CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела после аллогенной HSCT, при котором
 35 задействованные Т-клетки происходят от донора. Можно было наблюдать мощный вызов лечением CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом эффекта «трансплантат против лейкоза» (GvL) в отсутствие реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD) у двух пациентов с резистентным к химиотерапии рецидивом CD19+ ALL после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Поэтому
 40 в другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению ребенка с ALL можно лечить CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом после того, как ей/ему трансплантированы аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

В лучшем варианте развития событий предусматривается, что лечение детей с ALL CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом может заместить
 45 общепринятую терапию для ALL у детей, такую как химиотерапия и/или трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

Как показано в следующих примерах, лечение ребенка с острым лимфобластным

лейкозом (ALL) CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом способно к элиминации клеток острого лимфобластного лейкоза из организма пациентов до уровня, который ниже предела обнаружения. Предпочтительно, когда основной терапевтической целью введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, либо самого по себе, либо в комбинации с аллогенной HSCT, ребенку с ALL является перевод MRD-позитивного состояния в MRD-негативное состояние, приводящий к продолжению жизни без лейкоза, как здесь ниже определено. Как здесь показано, MRD-позитивные дети с ALL стали MRD-негативными после первого цикла лечения, в котором CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело непрерывно вводилось в течение пяти недель (в случае пациента 1) или четырех недель (в случае пациента 2). В случае пациента 1 за циклом лечения следовала трансплантация гаплоидных гемопоэтических стволовых клеток. По состоянию на ноябрь 2009 этот пациент остается в MRD-негативной полной ремиссии, т.е. без опухоли.

Продолжение непрерываемого введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела в стиле фармацевтических средств и способов в соответствии с настоящим изобретением в течение более длительных периодов времени делает возможным предпочтительную активацию Т-клеток, указанную в примерах, с проявлением ее эффекта в течение длительного времени, достаточного для предпочтительного удаления всех клеток острого лимфобластного лейкоза из организма. Поскольку скорость непрерываемого введения биспецифического одноцепочечного антитела сохраняют низкой, применение терапевтического средства может продолжаться дольше без риска вредных побочных эффектов для пациента.

Предпочтительно, чтобы используемое здесь CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело готовилось в форме фармацевтической композиции для введения являющемуся человеком ребенку, у которого диагностирован острый лимфобластный лейкоз (ALL). Указанный ALL может быть недавно диагностированным ALL, ALL, резистентным к химиотерапии и/или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), рецидивирующим ALL или рецидивирующим ALL, резистентным к химиотерапии и/или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению указанным острым лимфобластным лейкозом (ALL) у детей является острый лимфобластный лейкоз (ALL) из клеток В-линии у детей, предпочтительно острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников у детей. Подавляющее большинство случаев (>85%) ALL у детей является ALL с фенотипом В-клеток-предшественников. Было предложено несколько классификаций ALL из клеток В-линии (смотри, например, Schultz et al., Blood 109 (2007): 926-935). Для модулирования интенсивности терапии в связи с риском рецидива у пациента в настоящее время пациентов с ALL из В-клеток-предшественников распределяют по группам «низкого», «обычного», «высокого» или «очень высокого» риска, используя лабораторные и клинические параметры: возраст пациента, пол, уровень лейкоцитов (WBC) при проявлении болезни и присутствие или отсутствие специфических цитогенетических отклонений. Часто встречающиеся генетические отклонения, которые помогают определить эти группы риска, включают, например, транслокации t(12;21)[TEL-AML1], t(1;19;)[E2A-PBX], t(4;11)[AF4-MLL], t(9;22)[BCR-ABL], гипердиплоидию (или трисомию хромосом 4, 10 и 17) и гиподиплоидию; смотри, например, Schultz et al.; Bader et al., в процитированном месте. Используя данные различных исследований, классификационная система была разработана и внедрена как COG AALL03B1

(классификация острого лимфобластного лейкоза) (Raetz et al., *Personalized Med.* 2 (2005), 349-361; Schultz et al., *Blood* 109 (2007): 926-935). Поскольку CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело, описываемое здесь, направлено против связанного с В-

5 терапевтического средства для острого лимфобластного лейкоза из клеток В-линии у детей, предпочтительно для ALL из В-клеток-предшественников у детей. ALL из В-клеток-предшественников у детей можно далее подразделить на про-В-клеточный ALL, пре-В-клеточный ALL и общий В-клеточный ALL (сALL). Как показано в следующих примерах, лечение в соответствии со способами настоящего изобретения пациента 1
10 возрастном семь лет с общим В-клеточным ALL, резистентным к любому лечению и, следовательно, предрасположенному быть летальным, привело не только к полной гематологической ремиссии, но и к полной ремиссии на молекулярном уровне. Иначе говоря, после лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом минимальное остаточное заболевание больше невозможно было выявить у этого
15 пациента. Особенно предпочтительно, когда острым лимфобластным лейкозом (ALL) у детей является ALL из В-клеток-предшественников, более предпочтительно общий В-клеточный ALL. Важно, чтобы CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело было способно к уничтожению не только клеток ALL, имеющих реаранжировки генов TCR (Т-клеточных рецепторов) или иммуноглобулинов, но также клеток ALL с
20 различными другими цитогенетическими отклонениями. Например, было установлено у пациента 2, описываемого в следующих примерах, а также у взрослых пациентов с ALL, что указанное антитело способно к излечению ALL, характеризующегося реаранжировками генов иммуноглобулинов или TCR, транслокациями t(4;11) или транскриптами слияния bcr/abl (Ph+). Сообщалось, что особенно Ph+ ALL и ALL с
25 транслокациями t(4;11) было очень трудно лечить с использованием общепринятой терапии для ALL, но можно было с успехом вылечить с использованием CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела. Отмеченные данные означают, что CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело способно к излечению различных форм ALL, включающих, например, ALL, характеризующийся t(12;21)[TEL-AML1], t(1;
30 19;)[E2A-PBX], t(4;11)[AF4-MLL], t(9;22)[BCR-ABL], гипердиплоидией (или трисомией хромосом 4, 10 и 17), гиподиплоидией, а также реаранжировками генов иммуноглобулинов или TCR, смотри также таблицу 1.

Диагностирование ALL у детей основано на морфологических, цитохимических и иммунологических характеристиках клеток, в том числе морфологии лимфобластов в
35 мазках костного мозга с окрашиванием по Райту-Гимзе, позитивном окрашивании на концевую дезоксирибонуклеотидтрансферазу (TdT), негативном окрашивании на миелопероксидазу и экспрессии на клеточной поверхности 2 или более дифференцированных антигенов лимфоидных клеток – В-клеток-предшественников. Иммунофенотипирование описано, например, Behm F.G. (Immunophenotyping. In:
40 *Childhood Leukemias*, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209) и может быть выполнено с использованием, например, непрямой иммунофлуоресценции, иммуногистохимии и/или проточной цитометрии.

Термин «пациент» относится к пациенту-человеку. Упоминаемый здесь термин «ALL у детей» или «ребенок с ALL» обозначает детей возрастом от одного месяца до 18 лет.
45 Подразумевается, что указанный возраст является возрастом детей при диагностировании заболевания ALL. Детей можно, в частности, распределить по подгруппам: младенцев (возрастом от 1 до 12 месяцев), детей младшего возраста возрастом от 1 до 9 лет и детей старшего возраста и подростков (возрастом от ≥10 до

18 лет). Как здесь используется, промежуток времени, который определяется «от X до Y», приравнен к промежутку времени, который определяется «между X и Y». Оба промежутка времени, в частности, включают верхний предел, а также нижний предел. Это означает, что, например, промежуток времени «от одного месяца до 18 лет»
 5 включает «один месяц» и «18 лет». Предпочтительно, когда пациенту, подвергнутому лечению в соответствии с настоящим изобретением, самое большее 18 лет (включая пациентов возрастом 18 лет).

Как показано в следующих примерах, пациенту 1 с ALL, диагностированным в возрасте двух лет, было семь лет, когда он подвергся лечению CD19×CD3-
 10 биспецифическим одноцепочечным антителом. Пациенту 2 с ALL, диагностированным в 2001, было пятнадцать лет, когда он подвергся лечению CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом.

Вышеприведенные определения применимы с необходимыми поправками к термину «острый лимфобластный лейкоз (ALL) у детей», «ALL в детском возрасте» и т.п.

15 Например, под ALL у детей или в детском возрасте следует понимать ALL, диагностированный у ребенка возрастом от 1 месяца (включая 1 месяц) до 18 лет (включая 18 лет).

Хотя используемое здесь CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело может вводиться само по себе, предпочтительным является введение в фармацевтически
 20 приемлемом носителе. Примеры подходящих фармацевтически приемлемых носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом солевые растворы, воду, липосомы, различные типы смачивающих веществ, стерильные растворы и т.д. Включающие такие носители композиции могут быть составлены с использованием широко известных обычных способов. Эти фармацевтические
 25 композиции могут вводиться ребенку в соответствующей дозе. Штатный врач и клинические факторы будут определять схему дозирования. Как хорошо известно в области медицины, дозы для какого-либо одного ребенка зависят от множества факторов, включающих размер, площадь поверхности тела, возраст, вес тела пациента, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья
 30 и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы или суспензии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и инъеклируемые эфиры органических кислот, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, водные растворы или суспензии, в том числе солевой
 35 раствор и забуференные среды. Носители для парентерального введения включают раствор натрия хлорида, декстрозу в растворе Рингера, декстрозу и натрия хлорид, или раствор Рингера с лактатом. Носители для внутривенного введения включают жидкость и пищевые добавки, электролитные добавки (такие как те, которые основаны на декстрозе в растворе Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие
 40 добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие вещества и инертные газы и т.п. Кроме того, композиция могла бы включать белковоподобные носители, вроде, например, сывороточного альбумина или иммуноглобулина, предпочтительно человеческого происхождения.

Предусматривается возможное включение в композицию, помимо белковоподобного
 45 биспецифического одноцепочечного антитела, дополнительных биологически активных агентов в зависимости от намеченного применения фармацевтической композиции. Такими агентами могли бы быть агенты, действующие в качестве цитостатиков, агенты для предупреждения гиперурикемии, агенты, ингибирующие иммунные реакции

(например, кортикостероиды, FK506), лекарственные средства, оказывающие действие на сердечно-сосудистую систему, и/или такие агенты, как костимулирующие Т-клетки молекулы или цитокины, известные в данной области техники. Например, лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом может проводиться в сочетании с интратекальной химиотерапией в качестве профилактики в отношении ЦНС, кортикостероидами и/или аллопуринолом.

Предпочтительно составляют смесь определенного здесь CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела с буфером, стабилизатором и поверхностно-активным веществом. Буфером может быть фосфатный, цитратный, сукцинатный или ацетатный буфер. Стабилизатором может быть аминокислота(ы) и/или сахар. Поверхностно-активными веществами могут быть детергенты, ПЭГ или т.п. Более предпочтительно, когда составляют смесь CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, определенного здесь, с цитратом, лизином, трегалозой и Tween 80. В качестве разбавителя для фармацевтической композиции настоящего изобретения предпочтительным является изотонический солевой раствор и Tween 80.

Предпочтительно в фармацевтических способах и средствах настоящего изобретения, когда фармацевтическая композиция должна готовиться для введения являющемуся человеком ребенку, у которого диагностирован острый лимфобластный лейкоз (ALL).

Состоятельность терапии с использованием CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела можно контролировать посредством широко известных, стандартных способов для соответствующих категорий заболеваний: в случае терапии для В-клеточного ALL может использоваться анализ с использованием клеточного сортера с возбуждением флуоресценции (FACS), аспирация костного мозга и различные, специфичные для лейкоза, клинические химические параметры, и другие, широко известные, стандартные способы, известные в данной области техники. Способы и средства для определения состояния минимального остаточного заболевания (MRD) описаны здесь.

Цитотоксическую активность CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела можно определить с помощью способов, известных в данной области техники, и способов, проиллюстрированных, например, в WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению ALL из В-клеток-предшественников у ребенка(детей) является рецидивирующим и/или резистентным к лечению. При использовании современного лечения ALL в детском возрасте степени бессобытийной выживаемости составляют приблизительно 75%. Следовательно, 25% пациентов переносят рецидив, несмотря на лечение, сопровождающееся токсичностью и риском для здоровья. Проблемы в лечении рецидива ALL состоят в резистентности лейкозных клеток и снижении переносимости детьми второго цикла лечения после того, как они уже получили интенсивную терапию первой линии, что приводит к меньшей степени ремиссии, а также большей частоте возникновения последующего рецидива и худшему исходу в целом. В таком случае для вызова второй полной ремиссии весьма важна интенсифицированная поли-химиотерапия (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. In: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486). Используемый здесь термин «резистентный к химиотерапии и/или трансплантации аллогенных стволовых клеток» означает, что ребенок с ALL является резистентным к этим терапиям и поэтому перенес рецидив после общепринятого лечения ALL. Также предусматривается, что детям, перенесшим рецидив после лечения

CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом, назначается один или более дополнительных циклов лечения указанным антителом для того, чтобы перевести подвергаемых лечению детей в MRD-негативное состояние. Указанные пациенты могут быть затем подвергнуты, например, второй аллогенной HSCT.

5 Как показано в следующих примерах, фармацевтические способы и средства по настоящему изобретению особенно подходят для лечения детей, резистентных к общепринятым терапиям для ALL. Хотя указанные дети были подвергнуты интенсивному предварительному лечению с использованием как химиотерапии, так и трансплантации аллогенных стволовых клеток, пациенты перенесли рецидив несколько
10 раз. Поэтому пациенты имели очень неблагоприятный прогноз. Однако после лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом пациенты были MRD-негативными, т.е. продемонстрировали полную ремиссию на молекулярном уровне. Иначе говоря, с помощью лечения были элиминированы клетки острого лимфобластного лейкоза из организма ребенка до уровня, который ниже предела
15 обнаружения. Самым важным является то, что костный мозг детей был освобожден от лейкозных клеток.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению резистентным к химиотерапии и/или аллогенной HSCT является острый лимфобластный лейкоз (ALL) у ребенка(детей) в части MRD. Иначе
20 говоря, MRD у детей с ALL резистентно к химиотерапии и/или аллогенной HSCT.

Предусматривается, что фармацевтические средства и способы настоящего изобретения также подходят для лечения недавно диагностированного ALL у детей, при котором предусматривается альтернатива общепринятым схемам лечения ALL у детей, таким как химиотерапия и/или аллогенная HSCT.

25 В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления указанный острый лимфобластный лейкоз (ALL) рецидивирует в пределах трех лет от момента диагностирования, предпочтительно в пределах двух лет от момента диагностирования, даже предпочтительнее в пределах одного года от момента диагностирования. Предпочтительно указанный рецидив является костномозговым рецидивом.

30 Термин «химиотерапия» обозначает химиотерапию, используемую для лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей. Химиотерапия является первоначальным предпочтительным лечением ALL у детей (смотри, например, Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165; Schmiegelow K, Gustaffson G. Acute lymphoblastic leukemia. In: Cancer in Children: Clinical Management. Voute PA, Barret A, Stevens MCG, Caron HN (eds). London, UK, Oxford University Press, 2005, p. 138-170; Schmoll, Höffken, Possinger, в процитированном месте). Большинство детей с ALL оказываются получающими комбинацию различных лечений. При лечении ALL у детей нет
35 возможности хирургического выбора из-за распространения злокачественных клеток по всему организму. Как правило, цитотоксическая химиотерапия для ALL у детей объединяет множество противолейкозных средств в различных комбинациях.

Химиотерапия для ALL у детей состоит из трех этапов: вызова ремиссии, интенсификации и поддерживающей терапии. Химиотерапию также назначают для защиты центральной нервной системы от лейкоза. Целью вызова ремиссии является быстрое уничтожение
40 большинства опухолевых клеток и введение ребенка в полную гематологическую ремиссию. Ее определяют как присутствие менее 5% лейкозных бластных клеток в костном мозге (что определяют с помощью оптической микроскопии). Для вызова ремиссии используют, например, клофарабин, циклофосфамид, VP16, амсакрин, преднизон, мелфалан или цитарабин, отдельно или в комбинации. При интенсификации

используются высокие дозы химиотерапии с использованием множества лекарственных средств, вводимых внутривенно, для дальнейшего уменьшения опухолевой массы. В типичных протоколах интенсификации используется винкристин, циклофосфамид, цитарабин, даунорубин, этопозид, тиогуанин или меркаптопурин, назначаемые в виде групп в различных комбинациях. Поскольку иногда клетки ALL проникают в центральную нервную систему (ЦНС), большинство протоколов включает доставку химиотерапии в спинномозговую жидкость, общеизвестную как интратекальная химиотерапия. Некоторые раковые центры доставляют лекарственное средство благодаря резервуару Оммаи (устройству, хирургически размещаемому под скальпом и используемому для доставки лекарственных средств в спинномозговую жидкость и извлечения спинномозговой жидкости для различных анализов). Другие центры делают множество люмбальных пункций, по мере необходимости, для анализа и доставки лечения. Для этой цели обычно используется вводимый интратекально метотрексат или цитарабин. Целью поддерживающей терапии является уничтожение любой сохранившейся клетки, которая не была уничтожена при вызове ремиссии и схемах интенсификации. Хотя таких клеток немного, они будут вызывать рецидив, если их не уничтожить. Для этой цели используется ежедневно меркаптопурин, назначаемый перорально, раз в неделю метотрексат, назначаемый перорально, раз в месяц 5-дневный курс внутривенного введения винкристина. Продолжительность поддерживающей терапии составляет 3 года для мальчиков, 2 года для девочек и взрослых. Рецидивы с поражением центральной нервной системы лечат с помощью интратекального введения гидрокортизона, метотрексата и цитарабина. Так как схемы химиотерапии могут быть интенсивными и длительными (часто в течение приблизительно 2 лет в случае протоколов GMALL UKALL, HyperCVAD или CALGB; в течение приблизительно 3 лет для мужчин в протоколах COG), многие пациенты имеют внутривенный катетер, введенный в центральную вену (называемый центральным венозным катетером или катетером Хикмана), или Portacath (конусообразное небольшое устройство с силиконовой носовой частью, которое хирургически внедряют под кожу, обычно около ключицы). Однако химиотерапия остается высокотоксичной процедурой, особенно для детей.

Пациенты могут переносить рецидив ALL после первоначальной терапии и/или стать резистентными к химиотерапии после лечения. Дети с ALL, резистентные к химиотерапии, имеют явно неблагоприятный прогноз. В частности, неблагоприятным является прогноз для детей с Ph+ ALL или ALL с транслокациями t(4;11), который подвергали лечению только с использованием химиотерапии. Поскольку способ настоящего изобретения способен перевести детей с ALL в MRD-негативное состояние, он особенно полезен для лечения пациентов с ALL, резистентных к химиотерапии и/или аллогенной HSCT. Ввиду этого, термин «резистентный к химиотерапии и/или аллогенной HSCT» обозначает резистентность клеток острого лимфобластного лейкоза к химиотерапии и/или аллогенной HSCT.

Используемый здесь термин «трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT)» означает трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) или трансплантацию костного мозга, которая является медицинской процедурой в области гематологии и онкологии, которая включает трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Чаще всего ее выполняют в случае пациентов с заболеваниями крови или костного мозга или некоторыми типами рака, такими как ALL. Большинство реципиентов HSCT являются пациентами с лейкозом (например, ALL), которым могло бы помочь лечение высокими дозами химиотерапии или облучение всего тела. Аллогенная HSCT детям с ALL описана, например, в Schrauder A, et al. (Bone

Marrow Transplantation 41 (2008): Suppl2 S71-74). Однако трансплантация аллогенных стволовых клеток остается опасной процедурой, особенно для детей.

Используемый здесь термин «подходящий для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT)» означает, что трансплантация аллогенных стволовых клеток является необходимой терапией для ребенка с ALL. В тех случаях, когда ребенок с ALL является подходящим для трансплантации аллогенных стволовых клеток, могут предусматриваться следующие два варианта развития событий. Во-первых, в одном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению может использоваться введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (самого по себе или предпочтительно в виде фармацевтической композиции) для замещения трансплантации аллогенных стволовых клеток, используемой в качестве общепринятой терапии для детей с ALL, подходящих для трансплантации. Значит, способ настоящего изобретения может предотвратить риски для здоровья детей с ALL, связанные с аллогенной HSCT. Кроме того, приблизительно 30% подвергшихся трансплантации детей с ALL обычно переносят рецидив после трансплантации. Значит, способ настоящего изобретения может использоваться для лечения этих пациентов. В альтернативном варианте осуществления за непрерывной инфузией CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела ребенку с ALL может следовать трансплантация аллогенных стволовых клеток. В этом варианте осуществления введение фармацевтической композиции, включающей конструкцию CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, может использоваться для перевода состояния детей с ALL, подходящих для трансплантации, в MRD-негативное состояние до осуществления трансплантации. Таким образом, способ настоящего изобретения может использоваться для устранения MRD, которое приводит к меньшему риску рецидива, чем лечение с использованием трансплантации MRD-положительных пациентов. В следующих примерах представлен ребенок (пациент 1), которого сначала перевели в MRD-негативное состояние в результате лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом, с последующей аллогенной трансплантацией. До сих пор (ноябрь 2009) этот ребенок все еще является MRD-негативным.

Используемый здесь термин «не подходящие для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT)» предназначен для тех детей, в случае которых трансплантация аллогенных стволовых клеток не является предпочтительным лечением ALL, например, по медицинским причинам. Не исключен также случай, когда в наличии нет подходящего донора для трансплантации аллогенных стволовых клеток.

Соответственно, в одном варианте осуществления острый лимфобластный лейкоз (ALL) является резистентным к химиотерапии и/или аллогенной HSCT у детей, не подходящих или больше не подходящих для аллогенной HSCT. Например, клиническое состояние ребенка может быть настолько плохим, что нельзя было осуществлять трансплантацию аллогенных стволовых клеток по медицинским причинам.

Пациент 1, представленный в следующих примерах, не подходил для трансплантации аллогенных стволовых клеток до лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом вследствие его плохого состояния здоровья. В таком случае лечение CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом обеспечивает новый подход к лечению ALL у детей.

До настоящего времени ALL означал приговор для детей, резистентных к химиотерапии и не подходящих для аллогенной HSCT. Способ настоящего изобретения впервые обеспечивает лечение этой популяции детей, при котором устраняется

минимальное остаточное заболевание (MRD), которое иначе могло бы вызвать рецидив и, в конце концов, убить указанных пациентов.

В пределах объема фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению находится введение конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела детям с ALL, которые получили химиотерапию, отдельно или в сочетании с трансплантацией аллогенных стволовых клеток, и перенесли рецидив после этого.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ настоящего изобретения предназначен для лечения, уменьшения интенсивности или устранения минимального остаточного заболевания (MRD) у ребенка с острым лимфобластным лейкозом (ALL).

Термин «минимальное остаточное заболевание (MRD)», как здесь определяется, является термином, используемым после лечения, например, химиотерапевтическими средствами, когда лейкозные клетки нельзя выявить в костном мозге, используя стандартные анализы, такие как микроскопические способы. Предпочтительно, более чувствительные анализы, такие как проточная цитометрия (способы на основе FACS) или полимерная цепная реакция (ПЦР), должны использоваться для того, чтобы найти доказательство того, что лейкозные клетки остались в костном мозге ребенка с ALL. Конкретнее, присутствие лейкозных клеток на уровне, который ниже цитологического предела выявления (5% лейкозных клеток), получает определение «минимального

остаточного заболевания (MRD)». Если MRD не выявляется ($<10^{-4}$, т.е. меньше 1 лейкозной клетки на 10^4 клеток костного мозга, поддающихся обнаружению), достигнута полная ремиссия на молекулярном уровне (MRD-негативность или MRD-негативное состояние). Под «MRD-позитивным состоянием», как здесь определяется, подразумевается сигнал, определяемый с помощью ПЦР или FACS, превышающий предел выявления или количественный порог. Под «MRD-негативным состоянием», как здесь определяется, подразумевается сигнал, который ниже предела выявления или количественного порога, определяемый с помощью ПЦР или FACS. Прогностическое значение количественного определения минимального остаточного заболевания при ALL у детей было описано, например, Bader и др. (J. Clin. Oncol. 27 (2009): 377-384) или Eckert и др. (Lancet 358 (2001): 1239-1241). Состояние MRD можно определить с помощью анализа с использованием ПЦР или FACS, в котором количественно определяются характерные цитогенетические отклонения, указанные здесь, и/или реаранжировки генов иммуноглобулинов или Т-клеточных рецепторов (TCR). Например, с помощью анализа с использованием ПЦР можно выявить транскрипты слияния, такие как bcr/abl, или транслокации t(4;11), а также своеобразные клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов (IgH) и/или Т-клеточных рецепторов (TCR).

Как показано в следующих примерах, в результате лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом, описываемым здесь, все клетки острого лимфобластного лейкоза можно было элиминировать из организма детей с ALL, вследствие чего могла быть достигнута полная ремиссия на молекулярном уровне (т.е. MRD-негативное состояние).

Повторяющиеся хромосомные отклонения в злокачественных клетках детей и взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом являются признаками заболевания (Harrison and Foroni, Rev. Clin. Exp. Hematol. 6 (2002), 91-113). Специфические aberrации, которые часто служат признаком закономерных, лежащих в основе повреждений на молекулярном уровне, могут помочь в диагностировании или даже установить диагноз и определить оптимальную терапию. В случае ALL у детей были идентифицированы многочисленные цитогенетические подгруппы низкого и высокого риска, которые регулярно используются для отнесения пациентов к конкретным

терапии (Pui and Evans, N. Engl. J. Med. 354 (2006), 166-178). В случае ALL у взрослых роль цитогенетики в лечении пациентов была, главным образом, сфокусирована на присутствии филадельфийской (Ph) хромосомы, которая обычно возникает в результате транслокации t(9;22)(q34;q11.2) и приводит к слиянию BCR-ABL (Faderl et al., Blood 91 (1998), 3995-4019). Хотя общая частота возникновения Ph+ ALL у взрослых составляет приблизительно 25%, существует ее связь с возрастом, и она возрастает до более 50% среди пациентов старше 55 лет (Appelbaum, American Society of Clinical Oncology 2005 education book. Alexandria: ASCO, 2005: 528-532). Другие цитогенетические транслокации, связанные со специфическими молекулярно-генетическими отклонениями при остром лимфобластном лейкозе (ALL), представлены в таблице 1, а также описаны Schultz и др. или Bader и др., в процитированном месте.

Таблица 1	
Цитогенетическая транслокация	Молекулярно-генетическое отклонение
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL слияние (P185)
t(12;21)CRYPTIC	TEL-AML1 слияние
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX слияние
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4 слияние
t(8;14)(q24;q32)	IGH-MYC слияние
t(11;14)(p13;q11)	TCR-RBTN2 слияние

Цитогенетика признавалась во все возрастающей мере в качестве важного прогностического фактора исхода ALL (Moormann et al., Blood 109 (2007), 3189-3197).

Некоторые цитогенетические подтипы имеют более неблагоприятный прогноз, чем другие. Они, например, включают:

(i) Транслокация между хромосомами 9 и 22, филадельфийская хромосома (Ph+), встречается у приблизительно 20% взрослых и 5% детей с ALL.

(ii) Транслокация между хромосомами 4 и 11 встречается у приблизительно 4% пациентов и чаще всего у младенцев возрастом меньше 12 месяцев.

Реаранжировки иммуноглобулиновых генов или реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов (TCR) и их роль в ALL описаны в данной области техники (смотри, например, Szczepanski et al., Leukemia 12 (1998), 1081-1088).

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению указанный ребенок с ALL является MRD-положительным при полной гематологической ремиссии.

Под термином «ремиссия» или «полная гематологическая ремиссия» следует понимать отсутствие данных о заболевании ALL после стандартного лечения, например, после химиотерапии и/или трансплантации. Это означает, что в костном мозге содержится менее 5% бластных клеток, определяемых с помощью оптической микроскопии, уровни клеток крови находятся в границах нормы, и отсутствуют признаки или симптомы заболевания ALL. Тем не менее, не исключено, что было невозможно элиминирование всех лейкозных клеток из организма. Такой пациент, для которого хотя и была определена стадия нахождения в ремиссии или полной гематологической ремиссии, все еще является MRD-положительным. Эти остающиеся опухолевые клетки могут вызвать развитие рецидивирующего лейкоза. Фармацевтические средства и способы настоящего изобретения могут использоваться для уничтожения этих остающихся опухолевых клеток для того, чтобы предупредить рецидив лейкоза, возникающий из не выявляемых лейкозных клеток, остающихся в организме после первичной терапии. Таким образом, фармацевтические средства и способы помогают предупредить рецидив заболевания у детей с ALL.

Напротив, «полная ремиссия на молекулярном уровне» означает отсутствие данных по лейкозным клеткам в биопсиях костного мозга, даже после использования очень чувствительных анализов, таких как анализ с использованием ПЦР или FACS. Иначе говоря, если MRD не выявляется ($<10^{-4}$, т.е. меньше одной лейкозной клетки на 10^4 клеток костного мозга), достигнута полная ремиссия на молекулярном уровне.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению введение указанной фармацевтической композиции переводит позитивный по показателю минимального остаточного заболевания острый лимфобластный лейкоз (ALL) у детей в MRD-негативное состояние.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению MRD определяют с помощью количественного определения по крайней мере одного(ой) из цитогенетических отклонений или реаранжировок, выбираемых из группы, состоящей из:

t(12;21)[TEL-AML1];

t(1;19)[E2A-PBX];

t(4;11)[AF4-MLL];

t(9;22)[BCR-ABL];

гипердиплоидии или одновременной трисомии хромосом 4, 10 и 17;

гиподиплоидии (т.е. меньше 44 хромосом);

реаранжировок иммуноглобулиновых генов; и

реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов (TCR).

MRD определяют с помощью количественного определения по крайней мере одного из следующего: (i) характерных цитогенетических отклонений, указанных здесь, таких как транслокации t(12;21)[TEL-AML1], t(1;19)[E2A-PBX], t(4;11)[AF4-MLL], транслокация t(9;22)[BCR-ABL]; гипердиплоидия (или одновременная трисомия хромосом 4, 10 и 17; гиподиплоидия (т.е. меньше 44 хромосом); или (ii) реаранжировок иммуноглобулиновых генов или реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов (TCR), смотри также таблицу 1. Предпочтительно указанное количественное определение указанных цитогенетических отклонений или реаранжировок выполняют посредством использования, например, анализа с использованием ПЦР или FACS.

Способ настоящего изобретения обеспечивает терапевтический подход к лечению, уменьшению интенсивности или устранению MRD, уменьшая или даже устраняя, тем самым, риск рецидива для ребенка с ALL. Примечательно, что до сих пор в наличии еще не было способного к излечению лечения MRD у детей с ALL.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению у указанного ребенка, имеющего MRD, демонстрируется сигнал в отношении наличия цитогенетического отклонения, превышающий предел обнаружения, и/или по крайней мере один маркер на реаранжировку с чувствительностью $\geq 10^{-4}$. Предпочтительно, MRD определяют с помощью анализа с использованием ПЦР и/или FACS.

Характерные цитогенетические отклонения, указанные здесь, включают, например, транслокации t(12;21)[TEL-AML1], t(1;19)[E2A-PBX], t(4;11)[AF4-MLL], t(9;22)[BCR-ABL], гипердиплоидию (или трисомию хромосом 4, 10 и 17), гиподиплоидию.

Реаранжировки включают, например, реаранжировки иммуноглобулиновых генов или реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов (TCR); смотри также таблицу 1. MRD, представленное клетками ALL, несущими указанные цитогенетические отклонения и/или реаранжировки, можно выявить с помощью анализа с использованием ПЦР или FACS.

Например, используемый здесь термин «сигнал в отношении bcr/abl, превышающий предел выявления» означает, что анализ с использованием ПЦР или FACS приводит к поддающемуся обнаружению сигналу в отношении bcr/abl. Так же термин «сигнал в отношении транслокации t(4;11)» означает, что указанную транслокацию можно выявить с помощью ПЦР или FACS. Это распространяется с необходимыми поправками на другие цитогенетические отклонения или реаранжировки, указанные здесь. Термин «с чувствительностью, составляющей $\geq 10^{-4}$ », в связи с реаранжировками означает, что с помощью указанных способов можно выявить по крайней мере одну лейкозную клетку или более одной лейкозной клетки (с указанной реаранжировкой генов TCR или иммуноглобулинов) на 10^4 клеток костного мозга.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению период времени до рецидива на молекулярном уровне (выявляемого с помощью описанных выше анализов) составляет больше 6 месяцев, предпочтительно больше 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или даже предпочтительнее 2, 3, 4, 5 или более лет.

Термин «рецидив на молекулярном уровне» означает, что у указанного ребенка демонстрируется сигнал в отношении цитогенетического отклонения, превышающий предел выявления, и/или по крайней мере один маркер на реаранжировку с чувствительностью $\geq 10^{-4}$, при использовании ПЦР и/или FACS, как изложено выше.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению соответствующие вариабельные области тяжелых цепей (V_H) и соответствующие вариабельные области легких цепей (V_L) в указанной конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела располагаются, от N-конца к C-концу, в следующем порядке $V_L(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$.

Соответствующие вариабельные области тяжелых цепей (V_H) и соответствующие вариабельные области легких цепей (V_L) связывающих CD3 и CD19 доменов CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела представлены в SEQ ID NO: 3-10, соответственно. Соответствующие CDR-участки соответствующих V_H - и V_L -областей указанного CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела представлены в SEQ ID NO: 11-22.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению указанная конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела включает аминокислотную последовательность, отраженную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1 на по крайней мере 90%, предпочтительно на по крайней мере 95%.

В настоящем изобретении описывается молекула CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, включающая аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, а также аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 на по крайней мере 90% или предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно на по крайней мере 96, 97, 98 или 99%. В настоящем изобретении также описывается соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты, показанная в SEQ ID NO: 2, а также последовательность нуклеиновой кислоты, идентичная последовательности нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 2, на по крайней мере 90%, предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно на по крайней мере 96, 97, 98 или 99%. Следует принять к сведению,

что идентичность последовательности определяют по всей нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Кроме того, следует принять к сведению, что молекула биспецифического одноцепочечного антитела, включающая аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 на по крайней мере 90% или предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно на по крайней мере 96, 97, 98 или 99%, содержит все из последовательностей CDR, показанных в SEQ ID NO: 11-22. Для совмещения последовательностей можно использовать, например, программы Gap или BestFit (Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith and Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), которые содержатся в пакете программ GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)). Такое совмещение является обычным для квалифицированных в данной области техники специалистов способом определения и идентификации нуклеотидной или аминокислотной последовательности, идентичной нуклеотидной или аминокислотной последовательности CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, описываемого здесь, например, на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Например, в соответствии с гипотезой неоднозначного соответствия Крика 5' основание в антикодоне не является настолько пространственно ограниченным, как другие два основания и могло бы, следовательно, иметь нестандартное спаривание оснований.

Иначе говоря, третье положение в триплете может отличаться, так что два триплета, которые отличаются по этому третьему положению, могут кодировать один и тот же аминокислотный остаток. Указанная гипотеза хорошо известна квалифицированному в данной области техники специалисту (смотри, например, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J. Mol. Biol. 19 (1966): 548-555). Кроме того, обычной процедурой для квалифицированных в данной области техники специалистов является определение цитотоксической активности такой аминокислотной последовательности, идентичной нуклеотидной или аминокислотной последовательности CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, описываемого здесь, например, на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Цитотоксическую активность CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела или конструкции антитела, идентичной по последовательности аминокислотным последовательностям CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, например, на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, можно определить с помощью способов, проиллюстрированных, например, в WO 99/54440, WO 2004/106381 или WO 2007/068354.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению фармацевтическая композиция, включающая конструкцию CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, должна вводиться с помощью непрерывной инфузии в течение по крайней мере четырех недель с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения. Под одним циклом лечения следует понимать непрерывную инфузию указанного антитела в течение по крайней мере четырех недель с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения. За этим промежутком времени может, в свою очередь, следовать один или более циклов лечения или аллогенная HSCT. Предпочтительно указанное назначение непрерывной инфузии CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (т.е. одного цикла лечения) должно быть повторено по крайней мере два, три раза, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или даже вплоть до десяти раз, после определения MRD-негативного состояния, для консолидации.

В одном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению способ осуществляют перед трансплантацией аллогенных

стволовых клеток для перевода MRD-позитивного состояния ALL в MRD-негативное состояние.

В другом варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению способ осуществляют после аллогенной HSCT, например, в тех случаях, когда ALL у детей рецидивировал после общепринятой терапии для ALL с использованием химиотерапии и/или трансплантации аллогенных стволовых клеток.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 10 мкг до 100 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

Как здесь используется, диапазон доз, который определяется «от X до Y» приравнен к диапазону доз, который определяется «между X и Y». Диапазон включают верхний предел, а также нижний предел. Это означает, что, например, суточная доза, составляющая от 10 мкг до 100 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента, включает «10 мкг» и «100 мкг».

В даже более предпочтительном варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей 15 мкг, 30 мкг, 60 мкг или 90 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента. Даже более предпочтительно, когда указанное антитело должно вводиться в суточной дозе, составляющей от 15 мкг до 30 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента, наиболее предпочтительно - в суточной дозе, составляющей от 15 мкг до 30 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

Средняя площадь поверхности тела ребенка, как рассчитано, таким образом, применительно к способу или применению в соответствии с настоящим изобретением, находится в диапазоне от приблизительно 0,2 до 2,2 м². Для расчета смотри, например, формулы, предоставленные на <http://www.cato.eu/koerperoberflaeche-kinder.html>.

В другом варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению острый лимфобластный лейкоз (ALL) у детей является недавно диагностированным, резистентным или рецидивирующим ALL у детей, или резистентным и рецидивирующим ALL. Как здесь используется, термин «недавно диагностированный ALL» означает, что заболевание ALL было диагностировано у ребенка впервые.

В другом варианте осуществления фармацевтических способов и средств по настоящему изобретению указанный способ осуществляют в отношении пациента, подверженного высокому риску рецидива в соответствии с классификацией COGAALL03B1 острого лимфобластного лейкоза.

Предпочтительно фармацевтическая композиция, включающая CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело, описываемое здесь, кроме того, включает необязательно рабочий буферный раствор(ы), предназначенные для хранения растворов (исходные растворы) и/или остальные реагенты и материалы, необходимые для изложенного способа или применения. Кроме того, указанные компоненты могут быть упакованы по отдельности во флаконы или бутылочки или в комбинации в контейнеры или многоконтейнерные блоки.

Для того чтобы оценить безопасность и переносимость CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, описываемого здесь, соединение должно вводиться с помощью длительной непрерывной инфузии.

Было установлено, что положительные и неожиданные эффекты фармацевтических средств и способов настоящего изобретения можно достичь посредством введения

CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела в суточной дозе, составляющей от 10 мкг до 100 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела. Суточная доза может оставаться постоянной в течение периода введения. Однако в границах этого варианта осуществления также находится то, что в течение начального дня (дней) инфузионного периода вводится более низкая доза CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела («начальная доза») перед выполнением описываемых здесь фармацевтических способов, тогда как в течение остального инфузионного периода применяется более высокая доза («поддерживающая доза»). Это мероприятие может помочь адаптировать организм пациента к лечению антителом и/или избежать нежелательные побочные эффекты. Например, можно вводить 5 микрограмм биспецифического одноцепочечного антитела на каждый квадратный метр площади поверхности тела в качестве начальной дозы в первый день (дни) (например, в первый день, или в первый и второй день, или в первый, второй и третий день, и т.д. вплоть до седьмого дня) инфузионного периода с последующим введением 15 микрограмм на каждый квадратный метр площади поверхности тела в качестве суточной дозы в течение остального периода. Или 5 микрограмм биспецифического одноцепочечного антитела на каждый квадратный метр площади поверхности тела можно вводить в качестве начальной дозы в первый день (дни) инфузионного периода с последующим введением 30 или 45 микрограмм на каждый квадратный метр площади поверхности тела в качестве суточной дозы в течение остального периода. Также предусматривается, что можно вводить 5 микрограмм CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела на каждый квадратный метр площади поверхности тела в первый день (дни) инфузионного периода с последующим введением 15 микрограмм CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела на каждый квадратный метр площади поверхности тела в течение последующего дня (дней) инфузионного периода, а затем вводить 30 или 45 микрограмм на каждый квадратный метр площади поверхности тела в качестве суточной (поддерживающей) дозы в течение остального периода введения, составляющего всего по крайней мере 4 недели. Две начальные дозы могут вводиться не только в течение одного дня, но также в течение 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней и даже дольше. Средняя площадь поверхности тела пациента, как рассчитано, таким образом, применительно к фармацевтическим способам и средствам в соответствии с настоящим изобретением, находится в диапазоне от 0,2 до 2,2 м².

Непрерываемое введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела может быть внутривенным, парентеральным, подкожным, чрескожным, внутрибрюшинным, внутримышечным или легочным. В большинстве случаев внутривенный способ введения будет предпочтительным способом для непрерываемого введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела и, в зависимости от обстоятельств, для совместного введения фармацевтического средства в виде части схемы терапии. Как таковое, внутривенное введение является особенно предпочтительным. В этом случае может быть преимущественно выбрано подходящее дозирующее устройство, такое как предназначенный для множества терапий инфузионный нанос модели 6060, производимый Baxter. Какое бы дозирующее устройство не было выбрано, оно должно иметь такой дизайн или конструкцию, которая минимизируют или, лучше, исключает остановку введения терапевтического средства в случае замены резервуара и/или замены или перезарядки элемента питания. Это можно осуществить, например, посредством выбора устройства со вторым резервуаром раствора CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, помимо резервуара, который заменяют, так что непрерывная инфузия из этого второго резервуара ребенку

может продолжаться даже в то время, когда пустой или почти пустой резервуар удаляют и замещают новым резервуаром.

Способ внутривенного введения и, в зависимости от обстоятельств, совместного введения в виде части схемы котерапии включает имплантацию насоса в тело ребенка для дозирования такого введения. Специалист со средним уровнем компетентности в данной области техники знает о таких дозирующих насосах, например, модели 6060, производимой Baxter, как изложено выше.

В качестве неограничивающего примера, не исключено, что непрерываемое, т.е. непрерывное введение должно быть осуществлено с помощью небольшой насосной системы, которую носит ребенок или которая ему имплантирована для дозирования поступления терапевтического средства в организм пациента. Такие насосные системы в общем известны в данной области техники и обычно основываются на периодической замене резервуаров, содержащих терапевтическое средство, вводимое с помощью инфузии. При замене резервуара в такой насосной системе может следовать временное прерывание непрерываемого в других отношениях поступления терапевтического средства в организм ребенка. В таком случае все еще можно было бы считать в значении фармацевтических средств и способов настоящего изобретения, что этап введения до замены резервуара и этап введения после замены резервуара составляют вместе «непрерываемое введение» такого терапевтического средства. То же самое можно было бы применить к очень длительным введениям, при которых могла бы потребоваться замена резервуара более одного раза, или при которых могла бы потребоваться замена элементов питания, приводящих в действие насос, вызывая временное прекращение поступления терапевтического раствора в организм пациента.

Должны быть приняты соответствующие меры для минимизации риска инфицирования в месте введения - прокола в теле пациента, поскольку такие существующие в течение длительного периода раны особенно подвержены такому инфицированию. Вышесказанное также распространяется на внутримышечное введение посредством схожей системы доставки.

Непрерывное введение может быть чрескожным посредством пластыря, который находится на коже и заменяется время от времени. Квалифицированному в данной области техники специалисту известны пластырные системы для доставки лекарственных средств, подходящие для этой цели. Примечательно, что чрескожное введение особенно соответствует непрерываемому введению, поскольку замену первого истощенного пластыря можно преимущественно осуществить одновременно с размещением нового, второго пластыря, например на участке поверхности кожи, непосредственно примыкающем к первому истощенному пластырю, и непосредственно перед удалением первого истощенного пластыря. Проблемы, связанные с прерыванием потока или выходом из строя элементов питания, не возникают.

Кроме того, настоящее изобретение относится к конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела для лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, причем указанное CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело должно быть приготовлено для введения ребенку.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела для приготовления фармацевтической композиции для лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей. Следовательно, настоящее изобретение также относится к конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела,

определяемого здесь, для лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей. Варианты осуществления, описанные здесь применительно к фармацевтическим средствам и способом, применимы здесь с необходимыми поправками к приготовлению соответствующей фармацевтической композиции, включающей конструкции одноцепочечных антител против CD19×CD3, для введения ребенку, в частности, при лечении, уменьшении интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей.

Предпочтительно указанным острым лимфобластным лейкозом (ALL) у детей является острый лимфобластный лейкоз (ALL) из клеток В-линии у детей, предпочтительно острый лимфобластный лейкоз (ALL) из В-клеток-предшественников у детей, более предпочтительно про-В-клеточный ALL, пре-В-клеточный ALL или общий В-клеточный ALL (сALL) у детей. Даже предпочтительнее, когда ALL является сALL.

В предпочтительном варианте указанных медицинских применений указанный ALL из В-клеток-предшественников является рецидивирующим и/или резистентным к общепринятому лечению ALL, такому как химиотерапия и/или HSCT.

Предпочтительно указанный острый лимфобластный лейкоз (ALL) рецидивирует в пределах приблизительно трех лет от момента диагностирования.

В другом предпочтительном варианте указанных медицинских применений конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела предназначена для лечения, уменьшения интенсивности или устранения минимального остаточного заболевания (MRD) у ребенка с острым лимфобластным лейкозом (ALL).

Предпочтительно, когда указанный ребенок является MRD-позитивным при полной гематологической ремиссии.

В дальнейшем предпочтительном варианте указанных медицинских применений введение указанного CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела переводит MRD-позитивный острый лимфобластный лейкоз (ALL) у детей в MRD-негативное состояние.

Предпочтительно MRD определяют с помощью количественного определения характерных цитогенетических отклонений или реаранжировок, определенных здесь, используя анализ с использованием ПЦР и/или FACS.

Даже предпочтительнее, когда у ребенка с ALL демонстрируется сигнал в отношении цитогенетического отклонения, превышающий предел выявления, и/или по крайней мере один маркер на реаранжировку с чувствительностью $\geq 10^{-4}$.

В другом предпочтительном варианте указанных медицинских применений период времени до рецидива на молекулярном уровне, выявляемого с помощью указанных способов выявления, составляет больше 6 месяцев.

В другом предпочтительном варианте указанных медицинских применений соответствующие переменные области тяжелых цепей (V_H) и соответствующие переменные области легких цепей (V_L) в указанной конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела располагаются, от N-конца к С-концу, в следующем порядке $V_L(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$.

Предпочтительно, указанная конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела включает аминокислотную последовательность, отраженную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1 на по крайней мере 90%, предпочтительно 95%.

В дальнейшем предпочтительном варианте указанных медицинских применений

одним циклом лечения является непрерывная инфузия в течение по крайней мере четырех недель с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения.

Предпочтительно, когда указанное введение должно быть повторено по крайней мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять из десяти раз после определения MRD-негативного состояния.

В другом варианте осуществления введение осуществляют до трансплантации аллогенных стволовых клеток для перевода MRD-позитивного ALL в MRD-негативное состояние.

В альтернативном варианте осуществления введение осуществляют после трансплантации аллогенных стволовых клеток.

В другом предпочтительном варианте указанных медицинских применений конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 10 мкг до 100 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

Предпочтительно, когда конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 15 мкг до 30 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

В другом варианте указанных медицинских применений введение конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела замещает трансплантацию аллогенных стволовых клеток у детей, подходящих для трансплантации аллогенных стволовых клеток.

Варианты осуществления, определения и объяснения, предоставленные по отношению к фармацевтическим способам и средствам настоящего изобретения, применимы с необходимыми поправками к медицинским применениям конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, описываемой здесь.

На фигурах представлены:

Фиг.1. Механизм действия CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (CD19×CD3 bscab). CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело (SEQ ID NO: 1) перенацеливает CD3-позитивные цитотоксические Т-клетки на элиминацию клеток острого лимфобластного лейкоза человека, несущих антиген CD19.

Фиг.2. Несостоятельность общепринятой терапии для ALL у 7-летнего пациента с общим В-клеточным ALL. Спустя год после HSCT ребенок перенес второй костномозговой рецидив и получил последующую химиотерапию, включающую 1 цикл клофарабина/циклофосфамида/VP16, 2 цикла амсакрина, VP16, преднизона и 1 цикл мелфалана/цитабина. Несмотря на эту интенсивную химиотерапию, пациент имел персистирующее заболевание на морфологическом уровне на протяжении всего лечения, что демонстрировалось высокими уровнями MRD. Слева от у-оси указан % FACS-MRD, справа от у-оси указан ПЦР-MRD (от 10^0 до $<10^{-4}$), на х-оси представлены дни от первой HSCT; смотри пример 4.

Фиг.3. Успешное лечение ребенка посредством введения CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (CD19×CD3 bscab; SEQ ID NO: 1), на что указывают уровни MRD до, во время и после лечения указанным антителом. После несостоятельности общепринятой терапии для ALL пациента подвергали лечению с помощью непрерывной инфузии 15 мкг/м^2 CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (SEQ ID NO: 1) в течение 5 недель. В результате лечения антителом могла быть достигнута MRD-негативность. В 10/2008, т.е. спустя 2 недели после окончания лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом (в день 0 на фиг.3-5), он был подвергнут второй HSCT от своей гаплоидентичной матери, используя не связанную с отделением

миелоцитарного ростка кроветворных клеток схему подготовительного процесса, состоящую из клофарабина, тиотепа и мелфалана (Lang), которая показана прямоугольником «создание необходимых условий». Слева от у-оси указан % FACS-MRD, справа от у-оси указан ПЦР-MRD (от 10^0 до $<10^{-4}$), на х-оси представлены дни от первой HSCT, день «0» означает день второй HSCT (после лечения антителом); смотри пример 4.

Фиг.4. Развитие во времени уровней бластных клеток до и после лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом (CD19×CD3 bscab; SEQ ID NO: 1). Анализ костного мозга в день 10 лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом показал полную элиминацию бластных клеток из костного мозга (уровень MRD $<10^{-4}$) под действием антитела. Другой анализ костного мозга (BM) в конце лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом в день 35 подтвердил полное отсутствие лейкозных бластных клеток в костном мозге (уровень MRD $<10^{-4}$). Слева от у-оси указан уровень бластных клеток, определенный с помощью проточной цитометрии, в %, справа от у-оси указан уровень бластных клеток, определенный с помощью микроскопии, в %, на х-оси представлены дни от HSCT, при этом отрицательные дни означают дни от первой HSCT, день «0» означает день второй HSCT (после лечения антителом), а положительные дни означают дни после второй HSCT.

Фиг.5. Снижение уровней MRD в результате лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом (CD19×CD3 bscab; SEQ ID NO: 1). В результате лечения антителом могла быть достигнута MRD-негативность. На дату 6/2009 у пациента сохраняется MRD-негативная полная ремиссия на молекулярном уровне. Слева от у-оси указан % FACS-MOЗ, справа от у-оси указан ПЦР-MRD (от 10^0 до $<10^{-4}$), на х-оси представлены дни от HSCT, при этом отрицательные дни означают дни от первой HSCT, «0» означает день второй HSCT, а положительные дни означают дни от второй HSCT.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется следующими примерами.

Примеры

1. CD19×CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело

Создание, экспрессия и цитотоксическая активность CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела описаны в WO 99/54440. Соответствующие аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела указаны в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно. VH- и VL-области CD3-связывающего домена CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела указаны в SEQ ID NO: 7-10, соответственно, тогда как VH- и VL-области CD19-связывающего домена CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела указаны в SEQ ID NO: 3-6, соответственно.

2. Фенотипический анализ лимфоцитов и анализ химеризма

Для фенотипического анализа лимфоцитов и анализа химеризма образцы крови пациента получали до, во время и после лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом, используя содержащие EDTA пробирки для сбора образцов. Абсолютное число лимфоцитов в образцах крови определяли посредством дифференциального анализа крови в анализаторе Advia. Лимфоциты окрашивали, используя флуоресцентно меченные антитела, направленные против CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56 (все из которых получены от Becton-Dickinson, Heidelberg, Германия). Анализ меченных клеток и сбор данных проводили с использованием FACSCalibur (Becton-Dickinson).

3. Определение MRD

Для определения MRD использовали либо анализ на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Bader et al., в процитированном месте), либо анализ с использованием FACS. Вкратце, ДНК выделяли с использованием набора DNeasy Blood&Tissue (Qiagen GmbH, Hilden, Германия). Недавно было установлено, что реаранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов в качестве целей анализа с использованием ПЦР являются устойчивыми маркерами для контролирования остаточного минимального заболевания при остром лимфобластном лейкозе после трансплантации стволовых клеток (Kreyenberg, Leukemia, 2009).

4. Истории болезней

4.1 История болезни пациента 1

У 7-летнего пациента был диагностирован CD10+ общий В-клеточный ALL высокого риска (CD19-, CD34-позитивный, с уменьшением CD45, реаранжировками генов TCR, отсутствием вовлеченности ЦНС) в 2004. После лечения он перенес костномозговой рецидив в июне 2006 и был подвергнут лечению в соответствии с исследованием ALL-REZ BFM в группе S3. После двух циклов химиотерапии пациент имел персистирующее заболевание и достиг полной ремиссии после 3 циклов клофарабина. В 2007 ему были трансплантированы аллогенные гемопоэтические стволовые клетки от совпадающего по 9 из десяти HLA-аллелей донора, не являющегося родственником, после создания необходимых условий с помощью облучения всего тела и этопозида. Спустя год после HSCT он перенес еще один костномозговой рецидив и получил последующую химиотерапию, включающую 1 цикл клофарабина/циклофосфида/VP16 (Nobuko), 2 цикла амсакрина, VP16, преднизона (Hamburg) и 1 цикл мелфалана/цитарабина, смотри фиг.2. Несмотря на эту интенсивную химиотерапию, пациент имел персистирующее заболевание на морфологическом уровне на протяжении всего лечения, что очевидно на основе высоких уровней минимального остаточного заболевания из фиг.2. Затем в рамках применений препарата у неизлечимо больных он был подвергнут лечению с использованием непрерывной инфузии 15 мкг/м² CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела (блинатумомаба; SEQ ID NO. 1) в течение 5 недель; смотри фиг.3. Последовательные анализы популяций лимфоцитов до (в день 0) и во время лечения указанным антителом продемонстрировали впечатляющее размножение CD8+ Т-лимфоцитов, тогда как не было отмечено изменения в CD4+ Т-клетках и CD56+ NK-клетках. В результате лечения антителом могла быть достигнута MRD-негативность. Одновременный анализ химеризма показал 100% донорский химеризм. Как показано на фиг.4, анализ костного мозга в день 10 лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом показал полную элиминацию бластных клеток из костного мозга (уровень MRD <10⁻⁴). Другой анализ костного мозга в конце лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом снова показал полное отсутствие лейкозных бластных клеток в костном мозге (уровень MRD <10⁻⁴). Последовательный анализ MRD до, во время и после лечения указанным антителом отображен на фиг.5. До лечения антителом ребенок имел очень неблагоприятный прогноз и не подходил для HSCT из-за своего плохого клинического состояния. В результате лечения антителом могла быть достигнута MRD-негативность. Исключая транзиторные дискретные признаки атаксии, основные побочные эффекты не отмечались, и не наблюдались признаки реакции GvHD, несмотря на впечатляющее размножение полученных от донора CD8+ Т-лимфоцитов. В 10/2008, спустя 2 недели после окончания лечения CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом (т.е. в день 0 на фиг.3-5), он был подвергнут второй HSCT от своей гаплоидентичной матери, используя не связанную

с отделением миелоцитарного ростка кроветворных клеток схему подготовительного процесса, состоящую из клофарабина, тиотепа и мелфалана (Lang). На дату 11/2009 пациент оставался в MRD-негативной полной ремиссии.

4.2 История болезни пациента 2

5 В апреле 2001 у пятнадцатилетнего пациента был диагностирован Ph+ ALL из CD19+ В-клеток-предшественников. После химиотерапии ему трансплантировали гемопоэтические стволовые клетки от идентичного по HLA sibса в октябре 2001 после создания необходимых условий с помощью облучения всего тела (TBI) с использованием 12 грей и этопозида. В 2002 был диагностирован костномозговой рецидив, и еще одна
10 ремиссия была достигнута с помощью иматиниба и химиотерапии. Затем он был подвергнут второй HSCT от идентичного по HLA, не являющегося родственником донора в октябре 2004. В марте 2008 был диагностирован второй рецидив, и он был подвергнут лечению с использованием химиотерапии в низких дозах и дасатиниба из-за резистентности к иматинибу. После дополнительной химиотерапии с использованием
15 клофарабина и цитозина/арабинозида он достиг ремиссии на молекулярном уровне, и была осуществлена третья аллогенная HSCT от его не совпадающего по 3 из 6 HLA-аллелей гаплоидентичного отца с лечением дасатинибом после трансплантации. Вследствие желудочно-кишечного кровотечения и дилатационной кардиомиопатии дасатиниб был отменен спустя 5 месяцев после трансплантации. В апреле 2009 был
20 диагностирован комбинированный (сочетанный) рецидив с поражением центральной нервной системы (ЦНС), при этом было выявлено 7×10^9 /л бластных клеток в ЦНС и 3% бластных клеток в костном мозге. Затем пациента подвергли лечению нилотинибом, интратекальной химиотерапией и фракционированному облучению ЦНС с использованием 18 грей. Через три месяца после этого лечения костный мозг пациента
25 оставался MRD-положительным на уровне $1,1 \times 10^{-3}$, в то время как ЦНС была свободна от бластных клеток. С помощью анализа химеризма периферической крови выявлен полноценный гемопоэз с происхождением от донора – его гаплоидентичного отца.

Пациента затем подвергли лечению в рамках применения препарата у неизлечимо
30 больных одним средством блинатумомабом в дозе $15 \text{ мкг/м}^2/\text{день}$ в течение 4 недель посредством непрерывной инфузии без каких-либо побочных эффектов. Аспирация костного мозга в конце лечения показала полную ремиссию с не поддающимся обнаружению MRD в костном мозге на уровне, который ниже $<1 \times 10^{-4}$. Как и пациент 1, пациент 2 не демонстрировал какие-либо признаки реакции GvHD во время или после
35 лечения блинатумомабом. Спустя две недели после окончания лечения блинатумомабом у пациента наблюдалась транзиторная гемолитическая реакция, вызванная инфекцией. В настоящее время, спустя четыре недели после лечения, у пациента 2 нет рецидива. Он здоров и посещает школу.

4.3 Заключение

40 Пока имеющиеся в наличии лекарственные средства для лечения ALL обладают низкой специфичностью и воздействуют на ряд других клеток, приводя к тяжелым побочным эффектам, таким как иммуносупрессия, аплазия костного мозга, воспаление слизистой оболочки, невропатия, кардиотоксичность и алопеция. Поэтому срочно
45 требуются подходы с большей специализацией и меньшим количеством побочных эффектов. Кроме того, у клонов ALL некоторых пациентов, в частности, у клонов, возникающих после HSCT, развивается полная резистентность к общепринятой терапии, так что желательны лекарственные средства с отличным механизмом действия. При ALL у детей эффективность антителозависимой цитотоксичности через посредство

рецепторов для Fc NK-клеток и гранулоцитов в сочетании с химиотерапией можно было показать, используя моноклональное химерное антитело ритуксимаб. В настоящее время блинатумомаб является единственным антителом в клинических испытаниях, позволяющим задействовать цитотоксические Т-клетки для нацеливания на CD19 при В-клеточных неходжкинских лимфомах и лимфатических лейкозах. Полагают, что Т-клетки обладают большим цитотоксическим потенциалом, чем те клетки иммунной системы, которые задействуются при помощи обычных моноклональных антител.

Полагают, что эффект аллогенный GvL является одной из основных причин противолейкозной эффективности HSCT. К сожалению, возникновение эффекта GvL часто сопровождается реакцией GvHD, которая до сих пор является основной причиной осложнения и смертности после аллогенной HSCT. Поэтому вызов эффекта GvL в отсутствие реакции GvHD является предметом интенсивного исследования. Одним из подходов к вызову эффекта GvL является инфузия лимфоцитов донора (DLI). Хотя DLI является очень эффективной при лечении хронического миелолейкоза, она менее эффективна при посттрансплантационном лечении рецидивирующего ALL и часто приводит к возникновению хронической реакции GvHD со значительным ухудшением качества жизни пораженных детей.

Одним из возможных подходов к вызову GvL без GvHD является in-vivo активация полученных от донора Т-лимфоцитов после HSCT, используя низкие дозы действующего Т-клетки антитела блинатумомаба, которое может направить Т-лимфоциты против CD19+ бластных клеток ALL пациента. Это антитело продемонстрировало впечатляющую активность против лимфомы и лейкоза в ситуации аутологичной трансплантации, но никогда не проверялось при рецидивирующем ALL после HSCT или на детях. В ситуации аутологичной трансплантации ремиссии на молекулярном уровне были вызваны у 13 из 16 подающихся оценке взрослых пациентов с MRD-позитивным ALL. Оба ребенка, описанных выше, показали впечатляющую противолейкозную реакцию после инициирования лечения. В обоих случаях уровень MRD упал ниже уровня выявления без каких-либо признаков GvHD, несмотря на широкомасштабное размножение полученных от донора Т-клеток. Это могло быть обусловлено тем фактом, что действие блинатумомаба не зависит от правильной презентации пептидных антигенов и не может включать привлечение популяции необученных Т-клеток.

Настолько низкие, как 15 мкг/м^2 в день уровни доз блинатумомаба были достаточными для индукции размножения полученных от донора Т-лимфоцитов и элиминации бластных клеток ALL до уровня, который ниже уровня выявления MRD. Это указывает на то, что привлечение Т-клеток очень отличается от механизма действия обычных моноклональных антител, для которых требуются намного более высокие дозы и которые не могут задействовать цитотоксические Т-клетки из-за отсутствия у них рецепторов для Fc.

Блинатумомаб хорошо переносился обоими пациентами, вызывая лишь усталость, слабую атаксию и тремор степени 1-2 СТКАЕ. У пациента 2 побочные эффекты совсем не наблюдались, несмотря на интенсивные предварительные терапии, назначенные ему. Непрерывная внутривенная инфузия в течение нескольких недель хорошо переносилась обоими пациентами.

На основе этого первого клинического опыта в отношении ALL у детей авторы настоящего изобретения делают заключение, что блинатумомаб хорошо переносится и может быстро вызывать полные гематологические и MRD-негативные ремиссии у детей с резистентным к терапии заболеванием после множества рецидивов ALL из

CD19+ предшественников В-лимфоцитов после аллогенной HSCT. Стоит отметить, что ни один из пациентов не продемонстрировал какие-либо признаки GvHD, несмотря на размножение полученных от донора Т-лимфоцитов, даже после трансплантации от несовпадающего гаплоидентичного донора.

5 Эти первые результаты показывают, что лечение детей с острым лимфобластным лейкозом (ALL) CD19×CD3-биспецифическим одноцепочечным антителом способно привести к полной элиминации клеток острого лимфобластного лейкоза из организма детей. Важно, что это лечение приводило не только к полной гематологической ремиссии, но и к полной ремиссии на молекулярном уровне, при которой позитивный
10 по показателю минимального остаточного заболевания (MRD) острый лимфобластный лейкоз (ALL) переводился в MRD-негативное состояние. Лечение хорошо переносилось. Ввиду этого, введение CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела, описанного здесь, обеспечивает улучшенный вариант лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей, в частности, ALL, резистентного к химиотерапии и/или аллогенной
15 HSCT, и/или рецидивирующего ALL.

Результаты можно кратко суммировать следующим образом:

- Два ребенка были подвергнуты лечению на основе применения препарата у неизлечимо больных.
- Развитие MRD-негативности у указанных пациентов.
- 20 - Не наблюдались основные неблагоприятные воздействия (АЕ).
- Все АЕ были транзиторными, прерывания лечения не требовалось.

(57) Формула изобретения

1. Применение блинатумомаба для получения фармацевтической композиции для
25 лечения, уменьшения интенсивности или устранения острого лимфобластного лейкоза (ALL) у детей-пациентов, страдающих острым лимфобластным лейкозом (ALL), где указанный острый лимфобластный лейкоз (ALL) является резистентным к химиотерапии или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

2. Применение по п. 1, где указанный острый лимфобластный лейкоз (ALL) является
30 резистентным к химиотерапии и трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

3. Применение по п. 1 или 2, где указанный острый лимфобластный лейкоз (ALL) является рецидивирующим ALL или рецидивирующим ALL, резистентным к химиотерапии и/или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

35 4. Применение по любому из пп. 1-3, где способ направлен на лечение, уменьшение интенсивности или устранение минимального остаточного заболевания (MRD) у детей-пациентов, страдающих острым лимфобластным лейкозом (ALL).

5. Применение по п. 4, где указанный ребенок-пациент, страдающий острым лимфобластным лейкозом (ALL), является MRD-позитивным при полной
40 гематологической ремиссии.

6. Применение по любому из пп. 1-5, где соответствующие вариабельные области тяжелой цепи (VH) и соответствующие вариабельные области легкой цепи (VL) у указанной конструкции CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела располагаются от N-конца до C-конца в порядке VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL
45 (CD3).

7. Применение по п. 6, где указанная конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO. 1, или аминокислотную последовательность, имеющую

по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, идентичность последовательности SEQ ID NO. 1.

8. Применение по любому из пп. 1-7, где фармацевтическую композицию, содержащую указанную конструкцию CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела вводят с помощью непрерывной инфузии в течение по крайней мере четырех недель с последующим 2-недельным промежутком времени без лечения.

9. Применение по п. 8, где указанное введение должно быть повторено по крайней мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять из десяти раз после определения MRD-негативного состояния.

10. Применение по любому из пп. 1-9, где конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 10 мкг до 100 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

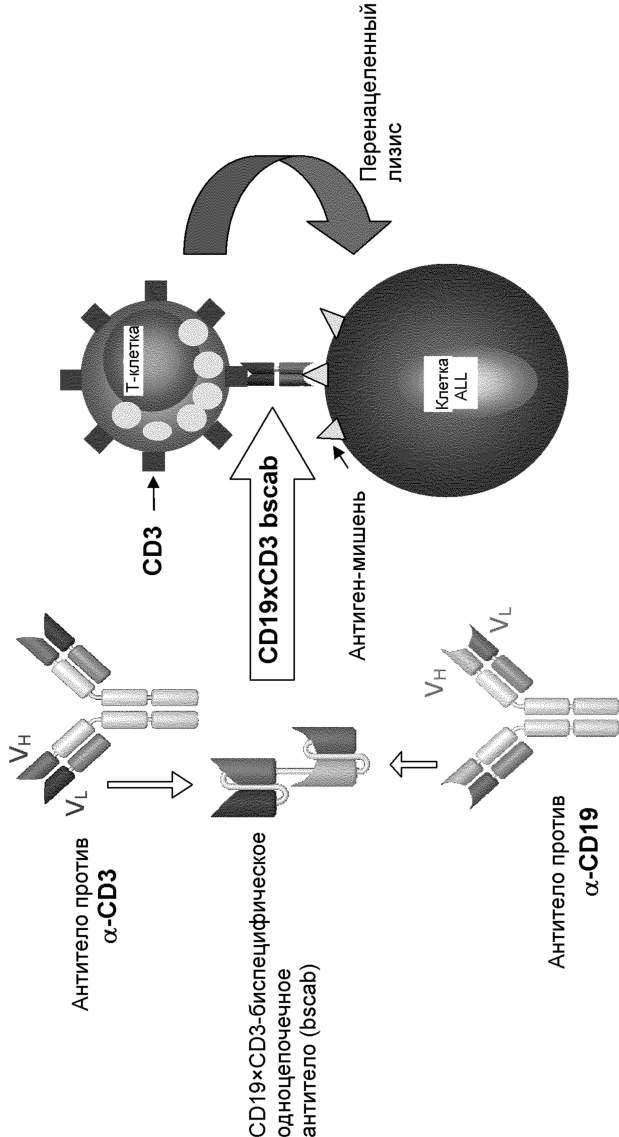
11. Применение по любому из пп. 1-9, где конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 15 мкг до 30 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

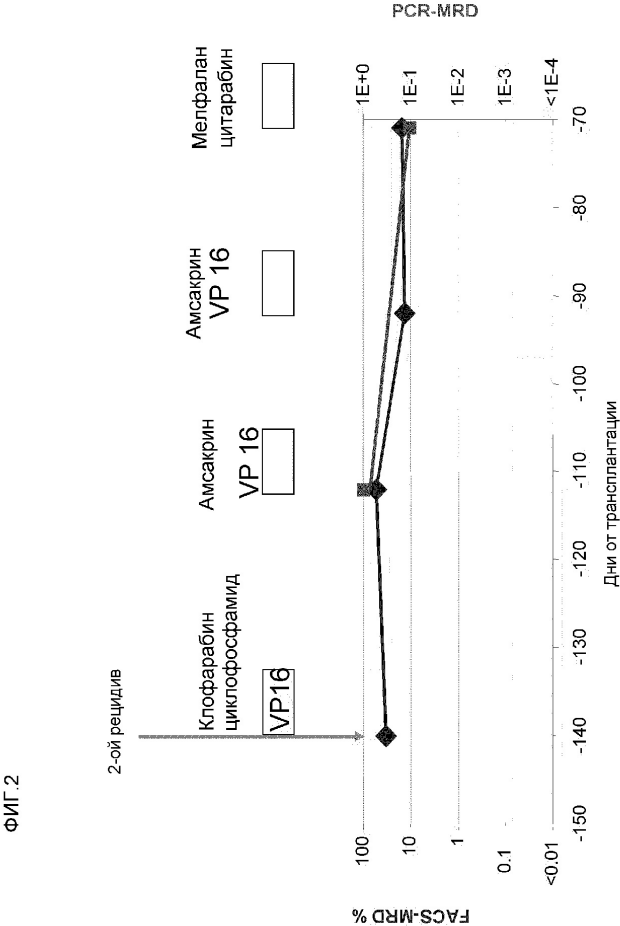
12. Применение по пп. 1-9, где конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в суточной дозе, составляющей от 15 мкг, 30 мкг, 60 мкг или 90 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента.

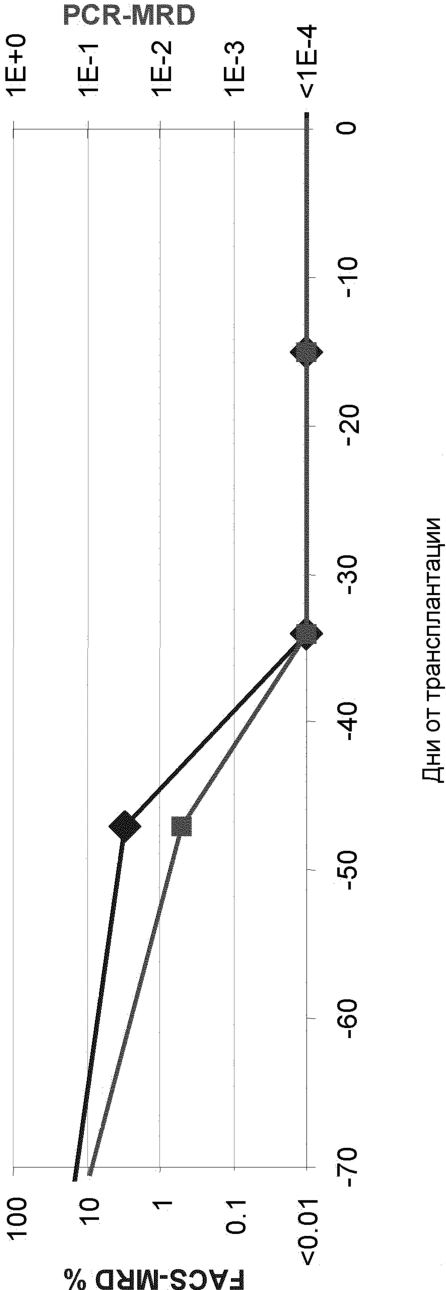
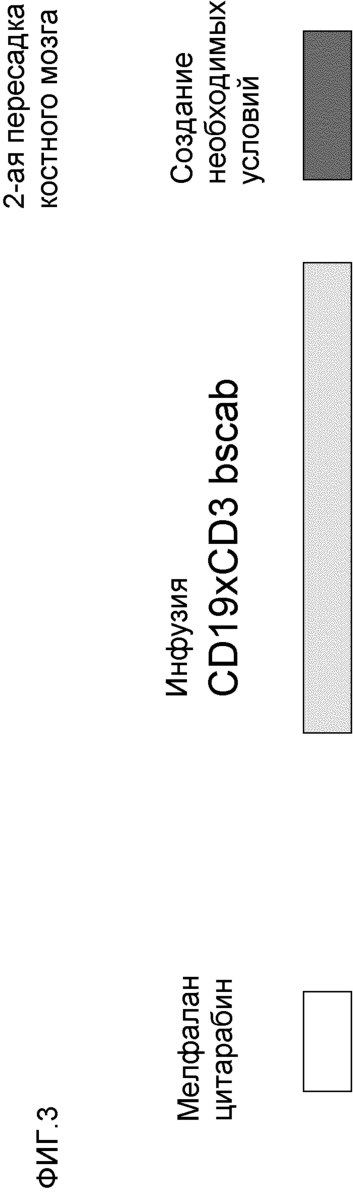
13. Применение по пп. 1-9, где конструкция CD19×CD3-биспецифического одноцепочечного антитела должна вводиться в дозе 5 мкг в первый(ые) день(дни) с последующим введением 15 мкг в последующий(ие) день (дни), а затем введением 30 мкг или 45 мкг на каждый квадратный метр площади поверхности тела пациента в качестве суточной дозы в течение остального периода введения, составляющего всего 4 недели.

14. Применение по п. 13, где первую дозу, составляющую 5 мкг, и вторую дозу, составляющую 15 мкг, на квадратный метр площади поверхности тела пациента вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней.

ФИГ. 1







ФИГ. 4

