



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201929865 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：107140068

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 07 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/65 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01)
C12N5/0783 (2010.01)

A61K31/737 (2006.01)
C07K14/725 (2006.01)

(30)優先權：2013/02/08 美國
 2013/04/12 美國

61/762,718
 61/811,526

(71)申請人：德商安美基研究(慕尼黑)公司(德國) AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH
 (DE)
 德國

(72)發明人：魯格梅爾吉爾哈德 ZUGMAIER,GERHARD (DE)；那高爾森狄爾克
 NAGORSEN,DIRK (DE)；史其爾朱爾根 SCHEELE,JURGEN (DE)；庫佛彼得
 KUFER,PETER (DE)；凱林格爾馬休斯 KLINGER,MATTHIAS (DE)；霍夫曼派翠
 克 HOFFMANN,PATRICK (DE)；娜格爾維爾吉尼 NAEGELE,VIRGINIE (DE)；
 多普菲伊蓮-派蘇帕堤 DOPFER,ELAINE-PASHUPATI (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：18 共 111 頁

(54)名稱

用於減輕 CD3 特異性結合域所導致可能不良事件之抗-白血球黏附

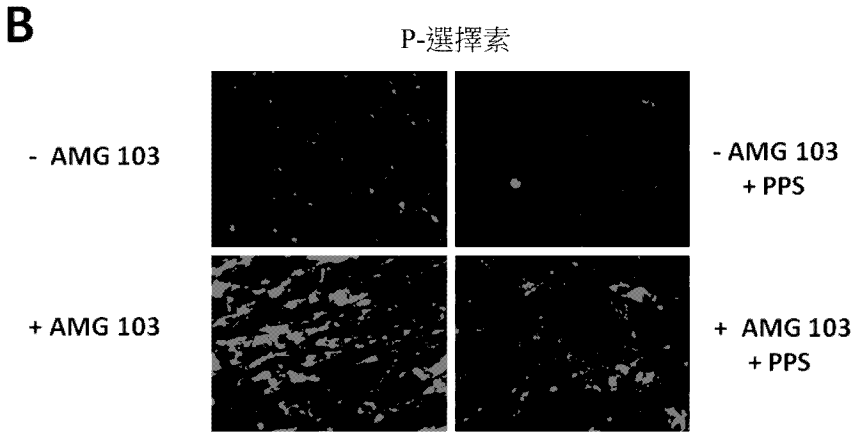
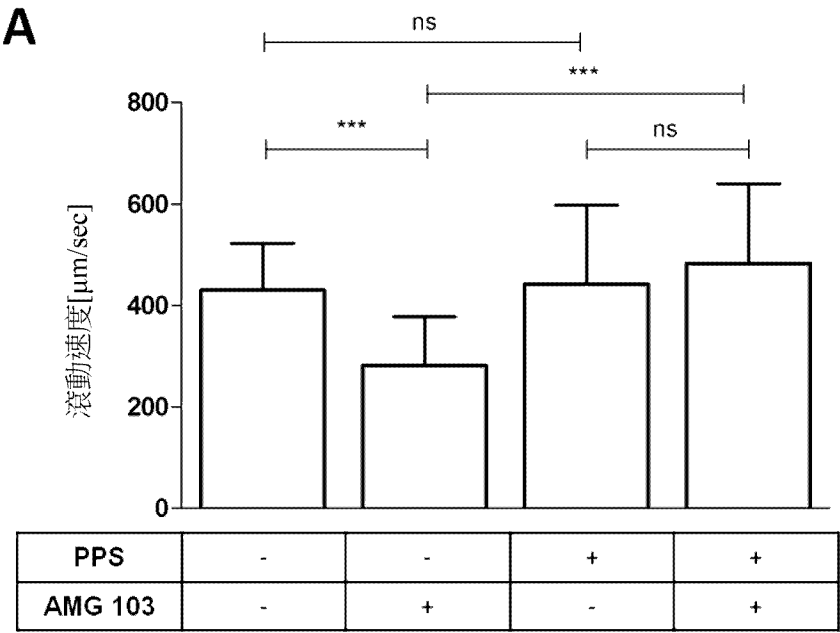
ANTI-LEUKOCYTE ADHESION FOR THE MITIGATION OF POTENTIAL ADVERSE EVENTS
 CAUSED BY CD3-SPECIFIC BINDING DOMAINS

(57)摘要

本發明本質上係關於一種減少或抑制哺乳動物 T 細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向 T 細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。亦涵蓋治療具有或有風險具有包含針對標靶細胞重導向 T 細胞之療法所導致臨床不良事件的患者之方法。

The present invention relates in essence to a compound which decreases or inhibits the binding of mammalian T-cells to mammalian endothelial cells for use in a method of prophylaxis and/or amelioration and/or treatment of clinical adverse events caused by therapy which comprises re-directing of T-cells against target cells in a patient. Methods of treatment of patients having or being at risk of clinical adverse events caused by therapy which comprises re-directing of T-cells against target cells are also contemplated.

指定代表圖：



【圖7】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於減輕CD3特異性結合域所導致可能不良事件之抗-白血球黏附

【英文發明名稱】

ANTI-LEUKOCYTE ADHESION FOR THE MITIGATION OF
POTENTIAL ADVERSE EVENTS CAUSED BY CD3-SPECIFIC
BINDING DOMAINS

【技術領域】

本發明本質上係關於一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。亦涵蓋治療具有或有風險具有包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法所導致臨床不良事件的患者之方法。此外，本發明係關於套組，其包含此等化合物中之任一者或其組合；CD3特異性結合域或編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸；及指示化合物或組合欲用於預防或改善包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法所導致臨床不良事件的封閉標籤或包裝插入物。

在本說明書之整個文本中引用若干文獻。本文引用之文獻(包括所有專利、專利申請案、科學公開案、製造商之說明書、說明等)中之每一者，無論在上文抑或下文，均以全文引用的方式併入本文中。以引用的方式併入之材料達到與本說明書矛盾或不一致之程度時，本說明書將替代任何該材料。不應將本文之任何內容解釋為承認本發明由於先前發明而無權優先於該揭示內容。

【先前技術】

在2012年，B細胞惡性疾病佔美國新診斷之癌症的大致5%。急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)及B細胞非霍奇金淋巴瘤(B-cell non-Hodgkin lymphoma, B-NHL)之年齡調整發病率分別為每年每100,000男性及女性1.6、4.2及16.5例(Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (編). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, 基於2011年11月SEER資料提交, 貼於SEER網站, 2012)。儘管有重複密集標準治療，但B細胞惡性疾病可能會對療法具頑抗性或在療法之後復發且經常保持不可治癒。因此，對用以改良此等患者群體之結果的創新治療模式之醫學需求較高。

基於抗體之癌症療法需要與癌細胞表面緊緊結合以便具有活性之標靶抗原。藉由與表面標靶結合，抗體可向癌細胞直接地或例如在其為雙特異性抗體時藉由募集細胞毒性T細胞間接地傳遞致命信號。在理想治療情形下，標靶抗原於每個癌細胞上大量地存在且可獲得，且於正常細胞上不存在、被遮蔽或量要少得多。此情況提供治療窗之基礎，其中規定量之基於抗體之治療劑有效擊中癌細胞但不傷害正常細胞。

單株抗體在約20年以前第一次添加至標準化學療法中，然而尚未證明此組合可完全治癒B細胞惡性疾病。近年來，使用雙特異性單鏈抗體之新穎治療方法已進入臨床研究且顯示有前景的初始結果。重導向T細胞之多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)就治療癌症標靶細胞而言特別受關注。重導向T細胞包含使T細胞具有不同於T細胞之純系型天然抗原受體特異性

的抗原受體特異性，亦即重導向之T細胞包含例如識別該等癌症標靶細胞之結合域。此例如可藉由T細胞銜接之雙或多官能抗體或抗體衍生物(諸如尤其包含CD3特異性結合域之雙特異性抗體)或藉由用嵌合抗原受體(CAR)(諸如識別CD19之CAR)轉導T細胞來達成(參見Knochenderfer等人, Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; 「Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors」)。靶向B細胞上之CD19或CD20及T細胞上之CD3的雙特異性抗體就治療B細胞惡性疾病而言特別受關注。蘭妥莫單抗(Blinatumomab)(有時亦表示為AMG 103或MT103)為由四種組裝至單一多肽鏈中之免疫球蛋白可變域組成的重組CD19×CD3雙特異性scFv抗體。兩個可變域形成CD19之結合位點，CD19為大多數正常及惡性B細胞上表現之細胞表面抗原。另兩個可變域形成CD3之結合位點，CD3為T細胞上之T細胞受體複合物之一部分。藉由與正常或惡性B細胞上之CD19結合且相伴地經由CD3銜接T細胞，蘭妥莫單抗誘導溶細胞突觸之形成(Offner等人 Mol Immunol. 2006; 43:763-71)，從而導致結合之B細胞之根除。蘭妥莫單抗經設計以針對多個B腫瘤細胞以多選殖方式重導向人體之細胞毒性T細胞。

各種評估蘭妥莫單抗之安全性及功效之臨床研究已於B-NHL (Bargou等人 Science. 2008; 321:974-7)與B前驅體ALL (Topp等人 J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8)中進行。此等研究向一般雙特異性單鏈抗體形式及特別蘭妥莫單抗於B-NHL、ALL及CLL中之高治療可能建立臨床概念驗證，且驗證其進一步發展。

儘管抗體為治療許多病症、尤其癌症之有效手段，但其投與未必不含副作用。臨床研究中之「副作用」，有時亦表示為「不良作用」或更經

常表示為「不良事件」(有時亦表示為「AE」)，為例如藉助於多特異性抗體或更佳包含CD3特異性結合域之雙特異性抗體用重導向之T細胞治療患者中之藥物所產生的有害且不當之作用。不良作用可能會對患者之健康狀況造成可逆或不可逆之變化。由於不良作用可能為有害的且甚至可能危及生命，因此極需避免其。

然而，難以設計不造成神經症狀之包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法(例如基於CD19×CD3雙特異性單鏈抗體之療法)，或換言之，需要提供此類患者耐受性增加，亦即有害副作用減少或甚至無有害副作用(諸如CNS AE)的療法(例如基於CD19×CD3雙特異性單鏈抗體之療法)。尤其需要使CNS AE減輕至避免因CNS AE而中斷治療之程度，因此使患者充分受益於治療。

因此，在此項技術中強烈需要提供減弱或甚至避免通常伴隨基於重導向之T細胞之療法(諸如利用CD19×CD3雙特異性單鏈抗體之療法)的上述副作用之手段及方法。

本發明著手於此需要，且因此提供一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物作為技術問題之解決方案，該化合物用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

本發明之其他實施例在本文中進行表徵及描述，且亦反映於申請專利範圍中。

【發明內容】

本發明提供一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重

導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

在一個實施例中，該化合物為一種化合物，其

- (a) 能夠與T細胞黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現，

且其減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

在另一實施例中，該化合物為一種化合物，其

- (a) 能夠與內皮黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少內皮黏附分子之表現，

且其減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

本發明亦提供一種鑑別用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中之化合物的方法，其包含：

- (a) 使該化合物與哺乳動物T細胞、哺乳動物內皮細胞、T細胞黏附分子及/或內皮黏附分子接觸；及
- (b) 評估該化合物是否：
 - (i) 減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合；
 - (ii) 能夠與T細胞黏附分子結合，

- (iii) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，
- (iv) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現，
- (v) 能夠與內皮黏附分子結合，
- (vi) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
- (vii) 抑制或減少內皮黏附分子之表現。

在一個實施例中，據設想，該包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法包括CD3結合域。

在另一實施例中，據設想，該包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法包括具有嵌合抗原受體(CAR)之基因工程改造之T細胞。

亦設想，根據本發明使用之化合物係在該包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法之初始給藥、再曝露(亦即再給藥，諸如後續給藥步驟)及/或劑量增加(在投與例如抗體時，此為慣例)之前及/或與其相伴投與。

本發明進一步提供一種套組，其包含如根據本發明定義或鑑別之化合物以及CD3結合域。

本發明亦提供一種套組，其包含如根據本發明定義或鑑別之化合物以及編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸。

一種醫藥組合物，其包含如根據本發明定義或鑑別之化合物以及CD3結合域。

本發明進一步關於一種CD3結合域，其係用於針對患者之標靶細胞重導向T細胞之方法中，其中該患者經受包含如本文中所定義之化合物的療法。

在一個實施例中，本發明係關於一種編碼嵌合抗原受體(CAR)之核

酸，其係用於針對患者之標靶細胞重導向T細胞之方法中，其中該患者經受包含如本文中所定義之化合物的療法。

在一個實施例中，該等臨床不良事件包含神經不良事件。

在另一實施例中，該/該等神經不良事件為以下一或多者：(i)認知病症，包含迷向/混亂及/或喚詞困難/失語；(ii)癲癇發作；(iii)部分觀測到之作為(i)或(ii)之視情況存在之前驅症狀階段之小腦症狀，包含動作性震顫、共濟失調、發音困難及手寫困難。

在本發明之情形下，尤其設想，該CD3結合域為雙特異性單鏈抗體。

在本發明之另一實施例中，該雙特異性單鏈抗體包含對B細胞具有特異性、較佳對可見於B細胞淋巴瘤上之CD標記(諸如CD19、CD22、CD20或CD79a，CD19為較佳)具有特異性之結合域。

在一個實施例中，該雙特異性單鏈抗體為CD19×CD3或CD20×CD3雙特異性單鏈抗體。

在本發明之其他實施例中，該嵌合抗原受體(CAR)包含對B細胞具有特異性、較佳對可見於B細胞淋巴瘤上之CD標記(諸如CD19、CD22、CD20或CD79a，CD19為較佳)具有特異性之結合域。

在本發明之尤其較佳實施例中，該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體為蘭妥莫單抗(有時亦表示為MT103或AMG103)。

在本發明之一進一步較佳實施例中，該患者之特徵為B/T細胞比率小於1:5或B細胞數目少於每微升周邊血液約50個B細胞。

據設想，在本發明之情形下使用之化合物係選自本文中所揭示之化合物。

本發明亦關於一種預防、改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法，該方法包含投與治療有效量之本文所定義之化合物。

在本發明之一個實施例中，與哺乳動物內皮細胞之結合由本文所定義之化合物減少或抑制的該等哺乳動物T細胞為重導向之哺乳動物T細胞。

如在此所述的在本發明之情形下提及之哺乳動物內皮細胞亦意欲自大血管或毛細管分離。

在一個實施例中，該等哺乳動物內皮細胞係選自人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)或人類腦微血管內皮細胞(HBMEC)，HBMEC為較佳。

在本發明之情形下，T細胞黏附分子係選自整合素(諸如 $\alpha 4$ -整合素； αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素)、選擇素(諸如L-選擇素)及/或CD44。

在本發明之情形下，內皮黏附分子係選自選擇素(諸如E或P-選擇素)、細胞黏附分子CAM (諸如ICAM-1、MAdCAM、VCAM-1)及/或PAR-1。

亦設想，在本發明之情形下，該患者為哺乳動物，較佳為靈長類動物，且最佳為人類。

【圖式簡單說明】

圖1. 在1期臨床研究中所選藥效學標記在以每天60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 之蘭妥莫單抗劑量治療的B-NHL患者之第1治療週期間之例示性時間進程。

分別展示周邊血液及血清中之細胞計數/百分比及蛋白濃度。**A.** T細胞再分佈之特徵為在輸注開始之後即刻(亦即已經在45分鐘)T細胞自周邊

血液快速消失。**B.** 細胞表面上具有中間親和力(亦即活化)LFA-1之T細胞數目增加達至峰值，同時發生T細胞再分佈。**C.** 在T細胞再分佈期間由活化內皮細胞釋放之Ang-2血清濃度增加。**D.** T細胞再分佈伴隨其他單核細胞(如關於例如單核白血球所示)自周邊血液消失，長期恢復至基線計數。

圖2. 導致蘭妥莫單抗所導致中樞神經系統不良事件之多步驟病理機制的當前假設。

A. 蘭妥莫單抗輸注開始或逐步增加其劑量可增加T細胞與血管內皮之黏附。**B.** 黏附T細胞活化內皮且開始外滲。活化內皮細胞吸引其他周邊血液白血球，例如單核白血球。外滲之T細胞分泌細胞因子及趨化因子，其又造成短暫性神經炎症及血液CSF障壁之擾動。

圖3. 三名接受用於預防或改善CNS AE及預防因該等CNS AE所致之治療中斷之PPS合併用藥的患者(**D**、**E**及**F**)與不接受PPS合併用藥之患者(**A**、**B**及**C**)相比的延遲T細胞再分佈動力學。

將T及B細胞計數展示為每微升周邊血液之絕對數目。時間軸給出各別治療週期內之時間段。指示蘭妥莫單抗劑量，例如每天5、15或60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。指示在輸注開始或任何給藥步驟之後的時間點0小時、45分鐘及2小時，其展現T細胞再分佈動力學差異。

圖4. 流動培養相對於靜態培養之內皮細胞的比較。

A. 將HBMEC在5 dyn/cm^2 之壁剪切應力下(左)或在靜態條件下(右)於 μ -載玻片 Luer I ^{0.4} Collagen IV中培養48小時。**B.** 將HUVEC在10 dyn/cm^2 之壁剪切應力下(左)或在靜態條件下(右)於 μ -載玻片 Luer I ^{0.4} ibiTreat中培養48小時。使用10倍物鏡進行顯微鏡分析。

圖5. 在短期條件下AMG 103對T細胞於HUVEC上之滾動及黏附的影響

響。

將新鮮分離之T細胞在37℃下經或不經AMG 103 (10 ng/ml)預培育40分鐘，隨後使T細胞在1 dyn/cm²之剪切應力下於流動培養之HUVEC上滾動45秒。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定黏附細胞之滾動速度及絕對數目。**A.** 資料表示T細胞滾動速度平均值±SD。***：P < 0.001。**B.** 資料表示黏附T細胞之絕對數目。**C.** PFA固定之HUVEC在使經(+AMG 103)或不經(-AMG 103) AMG 103預培育之T細胞在1 dyn/cm²之剪切應力下滾動45秒之後的免疫螢光染色。用20倍物鏡及UV光進行顯微鏡分析。ICAM-1及P-選擇素染色分別以紅色及綠色展示。

圖6. 在長期條件下AMG 103對T細胞於HBMEC上之滾動的影響。

A. 將新鮮分離之T細胞在添加或不添加AMG 103 (10 ng/ml)下用以在1 dyn/cm²之剪切應力下於流動培養之HBMEC上滾動120分鐘。在滾動開始之後即刻(0分鐘)及在於HBMEC上連續滾動45分鐘之後進行圖像擷取。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定滾動速度。資料表示T細胞滾動速度平均值±SD。***：P < 0.001；ns：P > 0.05 (不顯著)。**B.** PFA固定之HBMEC在使T細胞在存在(+AMG 103)或不存在(-AMG 103) AMG 103下在1 dyn/cm²之剪切應力下滾動120分鐘之後的免疫螢光染色。用20倍物鏡及UV光進行顯微鏡分析。ICAM-1、P-選擇素及VCAM-1染色分別以紅色、綠色及藍色展示。

圖7. 在長期條件下PPS對T細胞於經組織胺刺激之HBMEC上之滾動的影響。

A. 在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行新鮮分離之T細胞於經組織胺刺激、未經處理或經PPS預培育(200 µg/ml)

之流動培養HBMEC上之滾動60分鐘連續滾動。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點45分鐘之T細胞滾動速度平均值 $\pm$ SD。***：P < 0.001；ns：P > 0.05(不顯著)。B. PFA固定之經組織胺刺激、未經處理(-PPS)或經PPS預培育(+PPS)之HBMEC在T細胞在存在(+AMG 103)或不存在(-AMG 103) AMG 103下在1 dyn/cm²之剪切應力下滾動60分鐘之後的免疫螢光染色。用20倍物鏡及UV光進行顯微鏡分析。P-選擇素染色以綠色展示。

圖8. 在長期條件下PPS對T細胞於未經刺激之HBMEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行新鮮分離之T細胞於未經刺激、未經處理或經PPS預培育(200 µg/ml)之流動培養HBMEC上之連續滾動60分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點40分鐘之T細胞滾動速度平均值 $\pm$ SD。****：P < 0.0001；***：P < 0.001；**：P < 0.01；ns：P ≥ 0.05(不顯著)。

圖9. 在長期條件下那他珠單抗(natalizumab)對T細胞於未經刺激之HBMEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37℃下經或不經那他珠單抗(1 µg/ml)預培育10分鐘的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HBMEC上之連續滾動60分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點40分鐘之T細胞滾動速度平均值 $\pm$ SD。***：P < 0.001；*：P < 0.05；ns：P ≥ 0.05(不顯著)。

圖10. 在長期條件下米諾環素對T細胞於未經刺激之HUVEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37℃下經或不經米諾環素(50 µg/ml)預培育2小時的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HUVEC上之連續滾動45分鐘。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點40分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。****：P < 0.0001；ns：P ≥ 0.05(不顯著)。

圖11. 在長期條件下米諾環素對T細胞與未經刺激之HUVEC之黏附的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37℃下經或不經米諾環素(50 µg/ml)預培育2小時的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HUVEC上之連續滾動45分鐘。藉由手動細胞計數用顯微鏡測定黏附T細胞之絕對數目。資料表示在時間點40分鐘每圖像部分黏附T細胞之絕對數目。

圖12. 在長期條件下抗-ICAM-1抗體對T細胞於未經刺激之HBMEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行新鮮分離之T細胞於未經刺激、未經處理或經小鼠抗-人類ICAM-1抗體預培育(10 µg/ml)之流動培養HBMEC上之連續滾動45分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點30分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。***：P < 0.001；**：P < 0.01；ns：P ≥ 0.05(不顯著)。Ab：抗體。

圖13. 在長期條件下抗-P-選擇素抗體對T細胞於未經刺激之HBMEC

上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行新鮮分離之T細胞於未經刺激、未經處理或經小鼠抗-人類P-選擇素抗體預培育(10 µg/ml)之流動培養HBMEC上之連續滾動45分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點40分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。**: P < 0.01；*: P < 0.05；ns: P ≥ 0.05(不顯著)。Ab: 抗體。

圖14. 在長期條件下抗-CD11a抗體對T細胞於未經刺激之HBMEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37 °C下經或不經抗-CD11a抗體(5 µg/ml)預培育10分鐘的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HBMEC上之連續滾動45分鐘。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點10分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。****: P < 0.0001；ns: P ≥ 0.05(不顯著)。Ab: 抗體。

圖15. 在長期條件下抗-CD162抗體對T細胞於未經刺激之HBMEC上之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37 °C下經或不經抗-CD162抗體(10 µg/ml)或經小鼠同型對照抗體(10 µg/ml)預培育10分鐘的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HBMEC上的連續滾動45分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點45分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。****: P < 0.0001；*: P < 0.05；ns: P ≥ 0.05(不顯著)。Ab: 抗體。

圖16. 在長期條件下重組P-選擇素對T細胞於未經刺激之HBMEC上

之滾動的影響。

在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在1 dyn/cm²之剪切應力下進行在37℃下經或不經重組P-選擇素(5 µg/ml)預培育15分鐘的新鮮分離之T細胞於未經刺激之流動培養HBMEC上之連續滾動45分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤40個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點45分鐘之T細胞滾動速度平均值±SD。 **：P < 0.01；*：P < 0.05；ns：P ≥ 0.05(不顯著)。rec.：重組。

圖17. 在半短期條件下蘭妥莫單抗(AMG 103)對T細胞於重組人類黏附分子上之滾動的影響。

將新鮮分離之T細胞在37℃下在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下培育35分鐘，隨後在有或無AMG 103下在1.1 dyn/cm²之剪切應力下於重組蛋白上連續滾動15分鐘。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點t=45分鐘於**A. ICAM-1** (***)：P < 0.001)、**B. VCAM-1** (***)：P < 0.001)上及在時間點t=50分鐘於**C. P-選擇素** (****)：P < 0.0001)上之T細胞滾動速度平均值±SD。

此外，如上文所述使用Jurkat E6.1 T細胞替代新鮮分離之T細胞。藉由使用自動追蹤模組用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點t=45分鐘於**D. ICAM-1/VCAM-1** (***)：P < 0.001)及**E. P-選擇素** (**)：P < 0.01)上之T細胞滾動速度平均值±SD。

圖18. 在半短期條件下Src激酶抑制劑PP2對T細胞於重組人類黏附分子上之滾動的影響。

將在37℃下經Src激酶抑制劑PP2 (15 µM)或媒劑對照DMSO預培育40分鐘的新鮮分離之T細胞在37℃下在有或無AMG 103 (10 ng/ml)下在存

在PP2或DMSO下進一步培育35分鐘，隨後在 1.1 dyn/cm^2 之剪切應力下於重組人類VCAM-1上連續滾動15分鐘。就各條件而言，藉由手動追蹤30個T細胞用顯微鏡測定滾動速度。資料表示在時間點 $t=40$ 分鐘之T細胞滾動速度平均值 $\pm$ SD。***： $P < 0.001$ ；ns： $P \geq 0.05$ (不顯著)。

【實施方式】

各種評估蘭妥莫單抗之安全性及功效之臨床研究已於B-NHL (Bargou等人 Science. 2008; 321:974-7)與B前驅體細胞ALL (Topp等人 J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8)中進行。在B-NHL中，藉由連續靜脈內(civ)輸注投與低至每天 0.005 mg/m^2 之劑量超過四週致使周邊血液中B淋巴瘤細胞之完全及持續消除。在每天 0.015 mg/m^2 之劑量下第一次觀測到部分及完全反應，且大多數經每天 0.06 mg/m^2 之劑量治療之B-NHL患者經歷實質性腫瘤消退。蘭妥莫單抗在此適應症中亦致使惡性B細胞自骨髓及肝臟清除。在B前驅體ALL中，當用每天 0.015 mg/m^2 之劑量連續靜脈內輸注四週來治療時，患有微小殘餘疾病及復發或頑抗性疾病之患者達成血液完全反應。此等研究向一般雙特異性單鏈抗體形式及特別蘭妥莫單抗於B-NHL、ALL及CLL中之高治療可能建立臨床概念驗證，且驗證其進一步發展。B-NHL及B前驅體ALL之整個此等研究期間，評估若干藥效學標記。所選一般特徵應在下文加以描述：T細胞動力學呈現無關於循環B細胞之劑量或存在的極突出概況。其特徵為在輸注開始及任何給藥步驟之後快速再分佈，亦即循環T細胞在前6-12小時內快速消失且在後繼2-7天期間後續再現，其中高初始B細胞計數與減速之T細胞再現動力學相關(圖1A)。此過程似乎由蘭妥莫單抗之任何顯著劑量變化而非絕對血清濃度觸發。另外，整個第1治療週期間，藉由分析可溶ICAM-1-F_c融合蛋白與T細

胞上之LFA-1的結合來量測T細胞黏附性。LFA-1構形自開始輸注前之低親和力狀態改變為輸注開始及任何給藥步驟後之中間親和力狀態；增加之與ICAM-1之結合親和力在48小時內達至峰值且在此後5天內返回至基線(圖1B)。此發現與T細胞再分佈一致，且支持在再分佈期間蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮黏附的概念。

血管生成素-2 (Ang-2)為儲存於血管內層內皮細胞之細胞質內之所謂懷布爾-帕拉德體(Weibel-Palade body)中的內皮活化(或甚至內皮應力)之血清標記。一旦內皮細胞得以活化，則囊泡與細胞膜融合且將預先形成之Ang-2釋放至血清中。另外，結合囊泡之黏附分子(例如P-選擇素)從而呈現於細胞表面上，因此進一步增加血管內層內皮細胞之黏附性。Ang-2血清濃度之動力學藉由在T細胞再分佈期間達至峰值且在第1治療週內下降回至基線而類似於LFA-1介導之T細胞黏附性增加。最大Ang-2血清濃度與澈底T細胞消失一致，此觀測結果進一步指示顯著T細胞與血管內層內皮細胞之黏附(該等血管內層內皮細胞因此得以活化)為T細胞再分佈之潛在機制(圖1C)。

儘管未由蘭妥莫單抗直接銜接，但單核白血球呈現與T細胞類似之再分佈動力學。此發現進一步支持蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮結合致使內皮細胞活化之概念，此又上調其他黏附分子，且從而允許其他單核細胞與凝血細胞廣泛結合(亦即在輸注開始及任何給藥步驟之後循環凝血細胞之計數亦減少)。然而，周邊血液中單核白血球計數之恢復可能延長，此係由於活化之(例如藉由與活化之內皮細胞黏附)單核白血球傾向於在返回至循環中之前反式遷移至下層組織中(圖1D)。

基於上文，本發明人構想一種可能多步驟病理機制之假設，其尤其

可能導致重導向之哺乳動物T細胞(例如藉由蘭妥莫單抗重導向之T細胞)所導致中樞神經系統不良事件(CNS AE)。此假設在圖2中加以說明。

圖2A：蘭妥莫單抗之輸注開始或逐步劑量增加會增加T細胞與血管內皮之黏附。圖2B：黏附T細胞活化內皮且開始外滲。活化之內皮細胞吸引其他周邊血液白血球(例如單核白血球)，此又造成短暫性神經炎症及血液CSF障壁之擾動。

為了證實以上假設，本發明人設計一種合併用藥方案，其中將蘭妥莫單抗與類肝素戊聚糖聚硫酸酯(PPS) (P-選擇素之小分子抑制劑)相伴投與(Höpfner等人 J Pharm Pharmacol. 2003; 55:697-706)。在1期臨床研究中，藉由在蘭妥莫單抗之輸注開始之前及之後以及在蘭妥莫單抗之任何逐步劑量增加之前及之後用PPS短暫輸注患者，成功地測試抗-白血球黏附。已知P-選擇素可介導白血球與內皮細胞黏附之第一步驟，且似乎對於循環白血球經由腦膜微血管外滲至軟腦膜空間及腦膜中起尤其重要之作用(Kivisäkk等人 Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:8389-94)。

三名患者在每天5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 蘭妥莫單抗之開始輸注階段與第1治療週之後每天60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 給藥步驟階段期間均接受尤其靜脈內PPS輸注(關於其他細節，亦參見實例部分)。儘管此等三名患者因其周邊血液中之B:T細胞比率低故而顯現CNS AE之風險高(參見如PCT/EP2010/066207中所揭示之潛在基本原理)，但其中無一者因神經不良作用而必須中斷蘭妥莫單抗治療。因此，令本發明人相當驚訝的為，實際上可能藉助於減少重導向之T細胞與各別內皮細胞之黏附來減輕此等患者中之預期CNS AE。三名患者中之兩者在8週蘭妥莫單抗治療之後達成完全反應；一名患者在4週治療之後疾病穩定。此外，所有三名已接受用於減輕可能CNS AE之靜脈內PPS

的患者在蘭妥莫單抗之輸注開始或逐步劑量增加時均展示延遲之T細胞再分佈動力學(無CD19陽性標靶細胞存在下)(圖3)。如前所述，接受蘭妥莫單抗而無PPS合併用藥之患者在輸注開始或逐步劑量增加之後已經45分鐘一致地展示周邊血液中T細胞計數之快速減少(諸如圖3A、B及C中所示)。相比之下，在輸注開始或逐步劑量增加之後45分鐘，在所有三名已在輸注開始及給藥步驟階段期間接受PPS合併用藥之患者中，與各別基線值相比均未觀測到T細胞計數減少(圖3D、E及F)。在兩種情況(D及E)下，在45分鐘T甚至出現細胞計數增加。在一種情況(F)下，在2小時仍觀測到T細胞計數增加。再分佈過程及因此下層白血球與血管內皮之黏附因靜脈內PPS介入而明顯地減緩，此係由於在蘭妥莫單抗之輸注開始或逐步劑量增加之後2小時內未偵測到周邊血液中T細胞計數減少。

因此，鑑別患者中用於PPS之預測及預定作用模式的藥效學標記(亦即延遲之T細胞再分佈動力學)。接受PPS合併用藥的患者之臨床進程與此等生物標記觀測結果一致且亦與當前關於中樞神經系統不良事件之病理機制之假設的預測一致。因此，干擾白血球與血管內皮之黏附(亦即抗-白血球黏附)為一種用以預防或改善包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法(諸如蘭妥莫單抗(AMG 103))所導致副作用(諸如CNS AE)之基於機制之介入方法。

為了進一步研究及證實重導向之(人類)T細胞與各別(人類)內皮細胞之初始結合實際上導致上述CNS AE，本發明人另外建立一種測試系統，其在活體外系統(「流動系統」)中水動力流動條件下模擬重導向之(人類)T細胞及其他白血球於(人類腦)微血管內皮細胞上/與(人類腦)微血管內皮細胞之滾動、繫栓及黏附。此測試系統之其他細節可得自隨附實例，該

等實例極其且足夠詳細地解釋實驗設定(參見實例部分)。在此流動系統中，細胞滾動速度以及黏附細胞數目可容易由熟習此項技術者量測。預期干擾周邊血液細胞於內皮細胞上/與內皮細胞之多步驟滾動及黏附過程之任何(分子)步驟(亦即需求)會影響細胞滾動速度以及黏附細胞數目兩者。

向流動系統中添加CD3特異性結合域、尤其蘭妥莫單抗(從而產生重導向之T細胞)快速且顯著降低於人類腦微血管內皮細胞(HBMEC)上之T細胞滾動速度。同時，HBMEC藉由此等重導向之T細胞得以活化，此如其細胞表面上黏附分子P-選擇素、ICAM-1及VCAM-1之上調所示(參見圖6B)。然而，添加T細胞而無蘭妥莫單抗(產生非重導向之T細胞)不影響以上提及之內皮黏附分子之表現(參見圖6B)。此等觀測結果類似於且明確地對應於如患者中所見且本文中詳細描述之T細胞再分佈。此外，向流動系統中添加P-選擇素阻斷劑PPS(亦即用PPS預培育HBMEC)可有效阻斷蘭妥莫單抗誘導之於HBMEC上T細胞滾動速度降低。如向流動系統中添加蘭妥莫單抗之後所顯示，用PPS預培育可抵消任何蘭妥莫單抗誘導之作用且使T細胞滾動速度恢復回至與在不向流動系統中添加蘭妥莫單抗之情況下所觀測T細胞滾動速度之水準相當的水準。另外，當PPS存在於流動系統中時，HBMEC得以較小程度地活化，此如減少之P-選擇素之細胞表面表現所示。此等觀測結果支持以下臨床發現：添加減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物(諸如P-選擇素阻斷劑PPS)實際上能夠減少/延遲T細胞與內皮細胞之黏附，且從而預防、改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞之療法所導致臨床不良事件。

因此，所建立之流動系統在水動力流動條件下真實地模擬尤其重導向之T細胞於血管內層內皮細胞上/與血管內層內皮細胞之T細胞滾動及黏

附，此如在用包含針對標靶細胞重導向T細胞(其例如可用CD3特異性結合域(諸如蘭妥莫單抗)達成)之藥劑治療的患者中在T細胞再分佈期間所觀測。尤其，向患者輸注PPS及向流動系統中添加PPS分別對於T細胞再分佈及T細胞滾動速度之作用極其相當之處在於PPS清楚地干擾T細胞與內皮細胞之黏附。根據當前關於CNS AE之病理機制之假設，此干擾(亦即抗-白血球黏附，減少或抑制白血球(諸如哺乳動物T細胞且尤其重導向之T細胞)與哺乳動物內皮細胞結合)可治療、預防或改善由向患者投與包含針對標靶細胞重導向T細胞(其例如可藉由CD3特異性結合域或本文中別處解釋之CAR達成)之藥劑所導致的任何不良副作用(諸如CNS AE)。此外，本文中例示的所建立之流動系統能夠且可由熟習此項技術者用於鑑別一種化合物之方法中，該化合物用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。例示之流動系統因此適用於鑑別/定義具有抗黏附性質之化合物(尤其減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物)，其可在用例如CD3特異性結合域治療患者之前、同時及/或之後投與以便預防或改善該CD3特異性結合域所導致CNS AE。換言之，預期對流動系統中之白血球、尤其T細胞且最佳重導向之T細胞展現任何抗黏附作用(亦即例如與向流動系統中添加PPS所觀測到之作用相當，CD3特異性結合域誘導之於血管內層內皮細胞上T細胞滾動速度降低的恢復)的化合物當在用CD3特異性結合域治療之前、同時及/或之後投與時，可預防或改善由用該CD3特異性結合域治療患者所導致之任何CNS AE。該等化合物之鑑別改質及/或確認由於利用公認方法而為熟習此項技術者之簡單明瞭的任務。

本發明人因此已為解決本文中鑑別之技術問題作出鋪墊。

定義：

必須注意，如本文中所用，除非上下文另外明確指示，否則單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」包括複數個參考物。因此，例如提及「一種試劑(a reagent)」包括該等不同試劑中之一或多者，且提及「該方法(the method)」包括提及一般技術者已知的可針對本文所述之方法進行修改或替代之等效步驟及方法。

除非另外指明，否則在一系列要素之前的術語「至少(at least)」應理解為指系列中之每個要素。熟習此項技術者將認識到或頂多使用常規實驗即能夠確定本文所述之本發明的特定實施例的許多等效物。該等等效物意欲由本發明涵蓋。

每當在本文中使用時，術語「及/或(and/or)」包括「及(and)」、「或(or)」及「由該術語連接之要素的所有或任何其他組合(all or any other combination of the elements connected by said term)」之含義。

如本文中所用，術語「約(about)」或「大致(approximately)」意謂在既定值或範圍之 $\pm 20\%$ 內、較佳 $\pm 15\%$ 內、更佳 $\pm 10\%$ 內且最佳 $\pm 5\%$ 內。

在整個本說明書及隨後之申請專利範圍中，除非本文另有規定，否則詞語「包含(comprise)」及變化形式(諸如「包含(comprises/comprising)」)應理解為意指包括所述整體或步驟或整體或步驟之群組而不排除任何其他整體或步驟或整體或步驟之群組。當在本文中使用時，術語「包含(comprising)」可經術語「含有(containing)」或「包括(including)」替代，或有時當在本文中使用時，經術語「具有」替代。

當在本文中使用時，「由……組成(consisting of)」排除技術方案要素中未規定之任何要素、步驟或成分。當在本文中使用時，「基本上

由……組成(consisting essentially of)」不排除並不實質影響技術方案之基本及新穎特徵之材料或步驟。

在本文中之各情況下，術語「包含」、「基本上由……組成」及「由……組成」中任一者可經其他兩個術語中之任一者替換。

在一個實施例中，本發明係關於一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

術語哺乳動物T細胞之「結合(binding)」應理解為包括通常表徵白血球自血液系統而出之動作(一種通常表示為白血球外滲之過程)的熟知連續步驟中任一者。以上提及之步驟包括「白血球之滾動」(白血球不牢固地附著至內皮細胞但仍與血流一起受到牽引，由此導致白血球於內皮細胞表面上之滾動運動)；「白血球之繫栓」(有時亦表示為緊密附著：白血球緊密地附著至內皮細胞，而此相互作用之受體與參與滾動過程之受體不同)及「血球滲出步驟」(有時亦表示為反式遷移：先前多半球形白血球於內皮上擴散且主動地反式遷移通過內皮障壁)。本發明化合物影響所有此等步驟，或僅影響此等步驟中之一些，或僅影響此等步驟之一者。

本發明中應用之「化合物(compound)」(亦即減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物)為可謂例如作用於T細胞側上(亦即於T細胞黏附分子上)或於內皮細胞側上(亦即於內皮細胞黏附分子上)之化合物。然而，化合物亦可為作用於T細胞側與內皮細胞側上之化合物。當應用於本發明中時，該化合物減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合。因此，本發明化合物為對T細胞或內皮細胞或兩者有抗黏附作用之化合物。舉例而言，化合物可作用於T細胞黏附分子與內皮細胞黏

附分子上，或應用兩種或兩種以上化合物之混合物，一種化合物作用於T細胞黏附分子上且其他一或多種化合物作用於內皮細胞黏附分子上。抗黏附作用較佳包括化合物減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合。較佳之本發明化合物描繪於表1中。

亦設想，本發明化合物(亦即減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物)在+10 ng/ml AMG 103存在下能夠使於HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD ($\mu\text{m}/\text{sec}$)增加約30、40、50、60、70、80、90、100%或甚至更多(參見實例2)，如在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後45分鐘所觀測，在長期條件下評估PPS對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低之影響。雖然AMG 103使於HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD由 $430\pm 92 \mu\text{m}/\text{sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 $281\pm 96 \mu\text{m}/\text{sec}$ (+AMG 103)，但向流動系統中進一步添加PPS使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+PPS； $442\pm 156 \mu\text{m}/\text{sec}$)所觀測的 $483\pm 157 \mu\text{m}/\text{sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。

已知，T細胞經由黏附分子(亦即T細胞黏附分子及內皮細胞黏附分子)與內皮細胞相互作用。T細胞與內皮細胞黏附分子均屬於整合素、選擇素之家族及免疫球蛋白G (IgG)超家族。後者之特徵為具有免疫球蛋白域。作為存在於內皮細胞表面上之玻尿酸受體的CD44亦被視為T細胞黏附分子。

因此，減少或抑制T細胞與內皮細胞結合之較佳化合物分別為整合素拮抗劑、選擇素拮抗劑、Ig超家族細胞黏附分子拮抗劑或CD44拮抗劑。因此，在本發明之情形下應用之化合物較佳分別為整合素拮抗劑、選擇素拮抗劑、Ig超家族細胞黏附分子拮抗劑或CD44拮抗劑。在本發明之情形

下，此等拮抗劑中任一者均能夠減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合。

整合素拮抗劑在此項技術中通常已知；參見例如Curley等人 (1999), *Cellular and Molecular Life Science* 56, 427-441。選擇素拮抗劑在此項技術中已知；參見例如Lefer (2010), *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol* 40 283-294。CD44拮抗劑在此項技術中已知；參見例如Hirota-Takahata (2007), *J. Antiobiotics* 60, 633-639。對於IgG超家族細胞黏附分子拮抗劑，同樣如此。

減少或抑制T細胞與內皮細胞結合之化合物較佳為整合素拮抗劑、選擇素拮抗劑、Ig超家族細胞黏附分子拮抗劑或CD44拮抗劑，較佳可藉由將此類可能拮抗劑應用於如本文中、尤其實例2中所述之流動腔室分析來測試及/或鑑別，由此如上文所描述，拮抗劑在+10 ng/ml AMG 103存在下較佳使於HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD (μ m/sec)增加約30、40、50、60、70、80、90、100%或甚至更多。

如上文所描述作用於T細胞側上之化合物之特徵在於：

- (a) 能夠與T細胞黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現。

「T細胞黏附分子(T cell adhesion molecule)」為存在於T細胞表面上且在使T細胞與其他細胞(諸如內皮細胞)黏附方面起作用或具有作用的分子，後者在本發明之情形下為較佳。通常，T細胞黏附分子與內皮細胞之黏附分子相互作用。內皮細胞之黏附分子因此可被視為T細胞黏附分子之配位體。T細胞黏附分子與存在於內皮細胞表面上之配位體之間的相互

作用通常在T細胞黏附分子之結合位點(亦即配位體結合位點)與其指定配位體(亦即內皮細胞之黏附分子)之間發生。

如本文中所述之T細胞黏附分子較佳具有免疫球蛋白超家族域。此類黏附分子較佳為較佳具有RGD結合域之整合素，諸如 $\alpha 4$ -整合素、 αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素；選擇素，諸如L-選擇素；或CD44。T細胞使用整合素及/或選擇素及/或CD44以發生進出血管及/或淋巴結之遷移，隨後例如遷移至其他組織、軟腦膜或血管周空間中。CD44主要充當存在於使血管對直之內皮細胞之表面上的玻尿酸受體。

在一個實施例中，本發明化合物之特徵在於能夠與T細胞黏附分子結合。因此，化合物結合T細胞黏附分子且因此較佳使T細胞黏附分子流出，以使得T細胞黏附分子減少，較佳不再能夠與內皮黏附分子相互作用。由於化合物與T細胞黏附分子結合，因此T細胞至少會減少，較佳不再能夠與內皮黏附分子相互作用。與T細胞黏附分子結合之較佳化合物為能夠與另一分子(諸如脂質運載蛋白突變蛋白或抗體、較佳單株抗體)結合之分子。較佳地，結合分子可特異性靶向T細胞黏附分子。因為抗體滿足彼準則，所以與T細胞黏附分子結合之較佳化合物為抗體，較佳為單株抗體，諸如那他珠單抗、依法珠單抗(Efalizumab)或艾托珠單抗(Etrolizumab)。

另外或替代地，本發明化合物之特徵在於能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點。「阻斷(Blocking)」意謂防止T細胞黏附分子之結合位點與其在內皮細胞上之配位體、較佳與其配位體之結合位點相互作用。由於化合物阻斷T細胞黏附分子之結合位點，因此T細胞至少會減少，較佳不再能夠與內皮黏附分子相互作用。T細胞黏附分子之結合位點之非限制性實例為

ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、MadCAM、GlyCAM、CD31 (PECAM-1)、CD62P (P-選擇素)、CD62E (E-選擇素)、CD62L、血纖維蛋白原及軟骨素之結合位點。

阻斷T細胞黏附分子之結合位點的較佳化合物為內皮細胞之細胞黏附分子之可溶片段，該等可溶片段較佳經修飾以便與T細胞黏附分子之結合位點結合而不導致生理學作用(諸如將信號轉導至T細胞)。

阻斷T細胞黏附分子之結合位點的較佳化合物為分別阻斷T細胞黏附分子上、例如VLA-4及/或LPAM-1上之ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、MadCAM、GlyCAM、CD31、CD62P、CD62E、CD62L、血纖維蛋白原及/或軟骨素結合位點的抗體、較佳單株抗體。此類抗體為那他珠單抗，其因此為在本發明中應用之較佳化合物。亦較佳作為本發明中應用之化合物的為阻斷T細胞黏附分子上之ICAM-1結合位點的抗體、較佳單株抗體。此類抗體為依法珠單抗，其因此為在本發明中應用之較佳化合物。

進一步較佳作為本發明中應用之化合物的為阻斷T細胞黏附分子上之VCAM-1及/或MadCAM結合位點的抗體、較佳單株抗體。此類抗體為艾托珠單抗，其因此為在本發明中應用之較佳化合物。

另一較佳化合物為AJM300，一種阻斷T細胞黏附分子之結合位點的小分子。

另一較佳化合物為SAR 1118，一種阻斷T細胞黏附分子上之ICAM-1、ICAM-2及/或ICAM-3結合位點的小分子。

另一進一步較佳化合物為BOL-303225-A，一種充當整合素 α L β 2及/或 α M β 2之拮抗劑的小分子。

另一較佳化合物為螯合劑，較佳為二價陽離子(諸如鈣)之螯合劑。較佳螯合劑為乙二胺四乙酸(EDTA)。

玻尿酸(HA)或硫酸軟骨素為進一步較佳化合物，此係因為已知兩者均可阻斷CD44上之HA及E-選擇素結合位點，從而阻斷T細胞上之CD44與內皮細胞之間的相互作用。

另外或替代地，本發明化合物之特徵為抑制或減少T細胞黏附分子之表現。此類化合物可作用於表現，包括轉錄及/或轉譯編碼T細胞黏附分子之基因，諸如抑制基因表現、干擾轉錄、剪接或轉譯。此可藉由例如由此項技術中已知之手段及方法進行RNA干擾來達成。然而，減少T細胞黏附分子之表現的其他化合物為已知的，諸如減少LFA-1表現之米諾環素；減少L-選擇素表現之(乙醯基-)水楊酸；減少CD44表現之落新婦苷(Astilbin)或類黃酮(亦參見本文中表1)。此等化合物為在本發明之情形下應用之較佳化合物，其中米諾環素為更佳。

作用於內皮細胞側之化合物之特徵在於：

- (a) 能夠與內皮黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少內皮黏附分子之表現。

「內皮細胞黏附分子(endothelial cell adhesion molecule)」為存在於內皮細胞表面上且在使內皮細胞與其他細胞(諸如白血球，尤其T細胞或單核白血球)黏附方面起作用或具有作用之分子。通常，內皮細胞之黏附分子與T細胞黏附分子相互作用。T細胞之黏附分子因此可被視為內皮細胞黏附分子之配位體。內皮細胞黏附分子與存在於T細胞表面上之配位體之間的相互作用通常在內皮細胞黏附分子之結合位點(亦即配位體結合位

點)與其指定配位體(亦即T細胞之黏附分子)之間發生。

如本文中所述之內皮細胞黏附分子較佳具有免疫球蛋白超家族域。此類黏附分子較佳為較佳具有RGD結合域之整合素，諸如ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、GlycAM-1或MadCAM。經由整合素及/或選擇素內皮細胞與例如T細胞連通及相互作用，以使得T細胞最終可如上文所描述外滲及遷移。

在一個實施例中，本發明化合物之特徵在於能夠與內皮黏附分子結合。因此，化合物結合內皮黏附分子且因此較佳使內皮黏附分子流出，以使得尤其T細胞黏附減少，較佳內皮細胞不再能夠與T細胞黏附分子相互作用。由於化合物與內皮細胞黏附分子結合，因此內皮細胞至少會減少，較佳不再能夠與T細胞黏附分子相互作用。與內皮黏附分子結合之較佳化合物為能夠與另一分子(諸如脂質運載蛋白突變蛋白或抗體、較佳單株抗體)結合之分子。較佳地，結合分子可特異性靶向內皮黏附分子。因為抗體滿足彼準則，所以與內皮黏附分子結合之較佳化合物為抗體，較佳為單株抗體，諸如PF-00547659。

另外或替代地，本發明化合物之特徵在於能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點。「阻斷」意謂防止內皮黏附分子之結合位點與其在T細胞上之配位體、較佳與其配位體之結合位點相互作用。由於化合物阻斷內皮黏附分子之結合位點，因此內皮細胞至少會減少，較佳不再能夠與T細胞黏附分子相互作用。內皮細胞黏附分子之結合位點之非限制性實例為 $\alpha 4$ -整合素、 αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素之結合位點。

阻斷內皮細胞黏附分子之結合位點的較佳化合物為T細胞之細胞黏附分子之可溶片段，該等可溶片段較佳經修飾以便與內皮細胞黏附分子之結

合位點結合而不導致生理學作用(諸如將信號轉導至T細胞)。

阻斷內皮細胞黏附分子之結合位點的較佳化合物為阻斷內皮細胞黏附分子上之 $\alpha 4$ -整合素、 αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素結合位點的抗體、較佳單株抗體。

亦較佳作為本發明中應用之化合物的為結合內皮細胞黏附分子(諸如 ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、GlycAM-1、MadCAM 或 PECAM-1)之抗體、較佳單株抗體。

進一步較佳作為本發明中應用之化合物的為結合P-選擇素(CD62P)之抗體、較佳單株抗體。此類抗體為因克拉單抗(Inclacumab)。

另一較佳化合物為阻斷內皮細胞黏附分子之結合位點的較佳低pM濃度下之凝血酶。

進一步較佳化合物為阻斷內皮細胞黏附分子上之PSGL-1結合位點的戊聚糖聚硫酸酯(PPS)。

另外或替代地，本發明化合物之特徵為抑制或減少內皮細胞黏附分子之表現。此類化合物可作用於表現，包括轉錄及/或轉譯編碼內皮細胞黏附分子之基因，諸如抑制基因表現、干擾轉錄、剪接或轉譯。此可藉由例如由此項技術中已知之手段及方法進行RNA干擾來達成。然而，減少內皮細胞黏附分子之表現的其他化合物為已知的，諸如羅素他汀(rosuvastatin)，一種減少VCAM-1之表現的小分子。

本發明係關於一種鑑別用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中之化合物的方法，其包含：

(a) 使該化合物與哺乳動物T細胞、哺乳動物內皮細胞、T細胞黏附

分子及/或內皮黏附分子接觸；及

(b) 評估該化合物是否：

- (i) 減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合；
- (ii) 能夠與T細胞黏附分子結合，
- (iii) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，
- (iv) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現，
- (v) 能夠與內皮黏附分子結合，
- (vi) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
- (vii) 抑制或減少內皮黏附分子之表現。

出於彼目的，意欲使用例如本文中所揭示之流動系統。可用於鑑別用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中之化合物的可能其他活體外分析之非排他性清單描繪如下：

- 反式遷移分析(Rohnelt, Hoch等人 1997，Ding, Xiong等人 2000)
- 與固定黏附分子之黏附分析(Gerli, Gresele等人 2001，Valignat, Theodoly等人 2013)
- 在靜態條件下與內皮細胞及T細胞之黏附分析(Mobley及Shimizu 2001)
- 在流動細胞學分析中該等化合物對T細胞上之黏附分子的干擾(Bucolo, Maltese等人 2008)

Bucolo, C., A. Maltese, F. Maugeri, K. W. Ward, M. Baiula, A. Sparta 及 S. Spampinato (2008). 「New coumarin-based anti-

inflammatory drug: putative antagonist of the integrins α L β 2 and α M β 2」. **J Pharm Pharmacol** **60**(11): 1473-1479。

Ding, Z., K. Xiong 及 T. B. Issekutz (2000). 「Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocytes by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells」. **J Leukoc Biol** **67**(6): 825-833。

Gerli, R., P. Gresele, O. Bistoni, C. Paolucci, L. Lanfranccone, S. Fiorucci, C. Muscat 及 V. Costantini (2001). 「Salicylates inhibit T cell adhesion on endothelium under nonstatic conditions: induction of L-selectin shedding by a tyrosine kinase-dependent mechanism」. **J Immunol** **166**(2): 832-840。

Mobley, J. L. 及 Y. Shimizu (2001). 「Measurement of cellular adhesion under static conditions」. **Curr Protoc Immunol** 第7章：第728單元。

Rohnelt, R. K., G. Hoch, Y. Reiss 及 B. Engelhardt (1997). 「Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium」. **Int Immunol** **9**(3): 435-450。

Valignat, M. P., O. Theodoly, A. Gucciardi, N. Hogg 及 A. C. Lellouch (2013). 「T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration」. **Biophys J** **104**(2): 322-331。

如本文中表1中例示，白血球與內皮細胞上之許多標靶分子以及相應干擾化合物已經加以鑑別、當前正在開發或已經批准用於人類中。因此，

設想本發明涵蓋就在用包含例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域(較佳蘭妥莫單抗)之化合物進行T細胞募集來針對標靶細胞重導向T細胞之療法治療患者之前、同時及/或之後投與而言，對如本文中所定義之流動系統中之白血球且更佳T細胞展現抗黏附作用的任何現有或未來之化合物(不論其作用模式如何)，其係用於預防或改善包含針對標靶細胞重導向T細胞之該(各別)療法所導致之CNS AE。

因此，在另一實施例中，本發明係關於對所述流動系統中之白血球滾動及黏附展現抗黏附作用之任何化合物。預期向流動系統中添加該化合物或該等化合物之任何組合可抵消由例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域之化合物進行T細胞募集來針對標靶細胞重導向T細胞誘導之白血球黏附，較佳蘭妥莫單抗誘導之T細胞與血管內層內皮細胞黏附，例如T細胞滾動速度恢復至與在不向流動系統中添加蘭妥莫單抗之情況下之水準相當的水準。本發明進一步關於該等化合物中之一或多者與用包含例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域之化合物進行T細胞募集來針對標靶細胞重導向T細胞之療法來治療患者於該治療之前、同時及/或之後的組合，其係用於預防或改善包含針對標靶細胞重導向T細胞之該(各別)療法所導致之CNS AE。換言之，設想本發明涵蓋一或多種具有抗黏附性質之化合物與包含例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域之化合物進行T細胞募集來針對標靶細胞重導向T細胞之療法的任何組合治療。又換言之，據設想，需要在用包含例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域之化合物進行T細胞募集來針對標靶細胞重導向T細胞之療法治療患者之前、同時及/或之後，投與該等化合物中任一者或其任何組合，用於預防或改善

包含針對標靶細胞重導向T細胞之該(各別)療法所導致之CNS AE。

在本發明之情形下，「抗-白血球黏附(anti-leukocyte adhesion)」定義為用以預防、最小化、減少、影響、減輕或改良於內皮細胞、較佳血管內層內皮細胞上之白血球滾動、與其結合、與其黏附、反式遷移通過其或與其相互作用的任何預防性及/或介入性量度、方法及/或程序。另外，包括於該等量度、方法及/或程序中或發揮上列對白血球之作用中任一者的化合物特此定義為「具有抗-白血球黏附作用之化合物」或「具有抗黏附性質之化合物」或「本發明化合物」或「減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物」。

根據當前假設，白血球與血管內皮之黏附為誘導需要治療中斷之嚴重不良作用(諸如CNS AE)之必需前提條件。因此，在本發明之情形下，AE (諸如CNS AE)之可能減輕方法為抗-白血球黏附，以便在各別藥劑(亦即包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法，例如蘭妥莫單抗，該療法造成內皮細胞活化且白血球外滲至CNS中)之輸注開始及逐步劑量增加之後，減少重導向之T細胞及亦視情況存在之其他白血球(亦即為外滲哺乳動物細胞之最顯著類型的T淋巴細胞、自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球粒細胞及單核白血球)之內皮黏附(參見本文中之論述及得自隨附實例之結果)。術語「哺乳動物T細胞(mammalian T-cell)」包含或由「重導向之T細胞(re-directed T-cell)」組成，此係由於此等重導向之T細胞導致如本文中解釋之AE。因此，在本發明之一較佳實施例中，該「哺乳動物T細胞」為「重導向之哺乳動物T細胞」。重導向T細胞包含使T細胞具有通常不同於T細胞之純系型天然抗原受體特異性的識別標靶細胞之抗原受體特異性。此可例如藉由包含能夠與T細胞受體、較佳與CD3特異性結合之特異

性結合域的T細胞銜接之雙或多官能抗體或抗體衍生物來達成。亦有可能(且在本發明之情形下明確設想)，該等重導向之T細胞藉由用嵌合抗原受體(CAR)(例如識別CD19之CAR)轉導T細胞而產生(參見例如Knochenderfer等人，Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; 「Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors」)。「重導向之T細胞」因此包括已與包含能夠與T細胞受體(較佳與CD3)特異性結合之特異性結合域的雙或多官能抗體或抗體衍生物接觸之T細胞，或已經基因工程改造以表現嵌合抗原受體之T細胞(亦即T細胞CAR：參見WO2007/131092，其以引用的方式包括於本文中)。

在一尤其較佳實施例中，該重導向之T細胞為已與蘭妥莫單抗(AMG103)接觸(由其結合)之人類T細胞。

「包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法(therapy which comprises re-directing of T-cells against target cells)」應理解為特徵為出現及/或存在「重導向之T細胞」之療法(諸如藥劑)，亦即療法包含或由重導向之T細胞組成，因此例如具有嵌合抗原受體CAR之基因工程改造之T細胞(視情況調配為醫藥組合物)及/或重導向之T細胞在由藥劑例示之療法過程中出現，該藥劑包含如本文中所定義之CD3特異性結合域(較佳CD3特異性結合域)以及對B細胞具有特異性之結合域，更佳為CD3特異性結合域以及對可見於B細胞淋巴瘤上之CD標記(諸如CD19、CD22、CD20或CD79a，CD19為較佳)具有特異性之結合域。在一更佳實施例中，包含針對標靶細胞重導向T細胞之該療法為使用雙特異性CD3×CD19抗體之療法，且在一最佳實施例中，包含針對標靶細胞重導向T細胞之該療法為使用蘭妥莫單抗之療法。

亦設想，使用蘭妥莫單抗之該療法涵蓋每天投與5至10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或更高之劑量，諸如每天15、45或60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。以上提及之CD-3特異性結合域在本文中別處極詳細地加以解釋。

嵌合抗原受體(CAR)為包含抗原識別部分及T細胞活化域之融合蛋白。就治療B細胞惡性疾病而言，由連接於例如CD3 ζ 之CD19特異性結合域組成之CD19 CAR已描述於關於B CLL (Porter等人 N Engl J Med. 2011; 365:725-33)及B ALL (Grupp等人 N Engl J Med. 2013)之臨床研究中。如在輸注CD19 $\times$ CD3雙特異性單鏈抗體之情況下所觀測，向患者中授受性轉移CD19 CAR轉導之T細胞致使正常及惡性B細胞快速且持續根除。與CD19 CAR T細胞療法相關之常見不良事件包括細胞因子釋放症候群及淋巴球減少症，但亦報導CNS AE之情況。因此，干擾CD19 CAR T細胞與血管內層內皮之黏附及反式遷移通過血管內層內皮亦為預防及/或改善CD19 CAR T細胞誘導之CNS AE的適用方法。注意，據設想，用靶向其他B細胞特異性抗原(例如CD20)之CAR T細胞治療亦將受益於與用於預防及/或改善該等CAR T細胞所導致CNS AE之具有抗黏附性質的化合物之合併用藥。

如本文中所用之「嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor, CAR)」包含對B細胞具有特異性、較佳對可見於B細胞淋巴瘤上之CD標記(諸如CD19、CD22、CD20或CD79a，CD19為較佳)具有特異性之結合域。已經基因工程改造以表現嵌合抗原受體CAR之T細胞(一種T細胞CAR)例示於WO2007/131092中。同時已知，包含T細胞CAR之療法亦觸發臨床不良事件，且尤其CNS AE。

術語「標靶細胞(target cell)」不受特定限制且較佳係關於癌症標靶

細胞(尤其表現使其可攻擊之適合標靶的癌細胞)。B淋巴瘤細胞為更佳，CD19陽性B細胞(B淋巴瘤細胞)為最佳。

術語「哺乳動物(mammalian)」包括(但不限於)小鼠、大鼠、犬、馬、駱駝、靈長類動物等，靈長類動物為較佳，且人類為最佳。

哺乳動物「內皮細胞」可自大血管或毛細管分離。術語「內皮細胞(endothelial cell)」從而包括新鮮分離之內皮細胞(例如HUVEC)、可自不同製造商(例如PromoCell)購得之內皮細胞及內皮細胞株，但內皮細胞株為次佳。人類內皮細胞為較佳。人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)及人類腦微血管內皮細胞(HBMEC)為尤其較佳，HBMEC為最佳。

不良事件可根據常見不良事件術語準則(Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE)分類為五個等級。等級1係關於輕度AE，等級2係關於中度AE，等級3係關於嚴重AE，等級4係關於危及生命或失能AE，而等級5意謂與AE相關之死亡。所有此等AE均涵蓋於本發明之構架內且由術語「臨床不良事件(clinical adverse event)」或「不良作用(adverse effect)」或本文中所用之相關術語包括在內。

本文中所用之術語包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致「臨床不良事件」尤其包含神經不良事件。有時亦表示為「神經症狀」或「神經不良作用」或「中樞神經系統不良事件(CNS AE)」之該神經不良事件包括(但不限於)人類患者之病況，諸如所有形式之疼痛、頭痛、肌肉無力/協調不能、平衡病症、話語病症/障礙、感覺紊亂/異常、頭腦昏沉、共濟失調、失用症、震顫、失語、言語困難、混亂、迷向、幻覺、小腦症狀、腦病、癲癇發作、(大發作)抽搐。特定言之，在用包含例如經由用CAR進行T細胞轉導或經由包含CD3特異性結合域之化合物進行T細胞

募集來針對標靶細胞重導向T細胞之療法治療期間觀測到的神經症狀包括例如混亂及迷向。如本文中所用之「混亂(confusion)」係指定向(其為藉由時間、位置及個人身分標識使其正確地置身於世界中之能力)及通常記憶(其為正確地回憶先前事件或學習新素材之能力)之喪失。患者通常難以集中精力，且思考不僅模糊及不清楚而且通常顯著減緩。具有神經症狀之患者亦遭受記憶喪失。混亂經常導致辨識人物及/或位置或分辨時間及日期之能力的喪失。迷向感在混亂中常見，且作決定之能力削弱。神經症狀進一步包含模糊話語及/或喚詞困難。此病症可能會削弱語言之表述及理解以及閱讀及書寫。另外，在一些患者中，眩暈及頭腦昏沉可能伴隨神經症狀。

術語「臨床不良事件」較佳特徵為(但不限於)以下一或多者：(i)認知病症，包含迷向/混亂及/或喚詞困難/失語；(ii)癲癇發作；(iii)部分觀測到之作為(i)或(ii)之視情況存在之前驅症狀階段之小腦症狀，包含動作性震顫、共濟失調、發音困難及手寫困難。其他神經不良事件為失用症及幻覺。在本發明之情形下，喚詞困難為較佳。具有特定臨床意義的為造成用包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法(較佳為用蘭妥莫單抗或其他CD3結合藥物或CAR之療法)之治療中斷之臨床不良作用，此係因為受治療患者因此不能充分受益於治療。

「患者(patient)」為哺乳動物患者，較佳為靈長類動物，最佳為人類。

在一較佳實施例中，懷疑/假定患者包含或已經包含惡性CD19陽性B細胞。在後一情況下，該患者已經被診斷為包含該等細胞。惡性CD19陽性B細胞存在於顯現及/或遭受淋巴瘤及/或白血病之患者中。

本發明亦關於一種編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸，其係用於針對患者之標靶細胞重導向T細胞的方法中，其中該患者經受包含「減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物」的療法。核酸序列從而包括(但不限於)將允許T細胞中之所要CAR表現之載體等(參見例如WO2007/131092，其以引用的方式包括於本文中)。

為了避免任何疑惑，特此強調，本發明之揭示內容(包括所有定義等)充分適用於形成本發明之一部分(亦即與本發明之要旨有關且因此屬於本發明之情形)的所有實施例，無關於此等實施例是否擬定為用於用途實施例或治療方法實施例或化合物實施例、套組實施例、組合物實施例、用途實施例、方法實施例等之化合物。因此，所有定義及實施例均可用於且適用於本文中所揭示之所有實施例。本發明因此亦關於一種預防、改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法，該方法包含投與治療有效量之減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物。術語「治療有效量(therapeutically effective amount)」意指減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物提供對包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件的治療、改善或預防(亦即提供「治療功效」)之量。

在下文中，意欲進一步說明CD3特異性結合域所導致中樞神經系統不良事件(CNS AE)之病因，及將抗-白血球黏附用於預防及改善該等CNS AE之基本原理。

需要治療中斷之CNS AE當前由引發短暫性腦膜或血管周神經炎症之多步驟病理機制的假設最佳解釋。

蘭妥莫單抗輸注開始及任何逐步劑量增加誘導周邊血液T細胞與其他

周邊血液白血球(諸如NK細胞及單核白血球)一起快速與血管內層內皮細胞黏附。此過程之發生與循環(亦即周邊血液)標靶細胞(亦即正常及/或惡性CD19陽性B細胞)之存在無關。此外，因T細胞與血管內皮黏附所致之T細胞再分佈似乎至少部分不依賴於蘭妥莫單抗劑量，此係由於其即使在所測試之每天0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 之最低劑量下亦可觀測到。因此，因短暫性T細胞黏附性增加所致之T細胞再分佈似乎由蘭妥莫單抗投與開始時及劑量增加期間之曝露變化本身而非由較高劑量下之較高絕對曝露觸發。周邊血液白血球之內皮黏附極可能亦在CNS之血管處發生，其中尤其已經表明腦膜微血管為來自周邊血液之發炎細胞的初始進入部位且為神經發炎性現象之可能起點。

如本文中更詳細描述，三個關鍵發現支持此假設：(1)任何患者中循環T細胞及其他白血球在輸注開始或逐步劑量增加後之再分佈包括血液細胞計數已經在45分鐘內快速減少，隨後血液細胞計數在幾天內恢復；(2)如由可溶ICAM-1-Fc融合蛋白與T細胞上之LFA-1的增加之結合所量測，循環T細胞與血管內層內皮細胞之黏附性有短暫性增加；及(3)周邊血液中之血管生成素-2 (Ang-2) (其代表內皮細胞活化之特異性標記)有短暫性增加(Fiedler及Augustin. Trends Immunol. 2006; 27:552-8)。

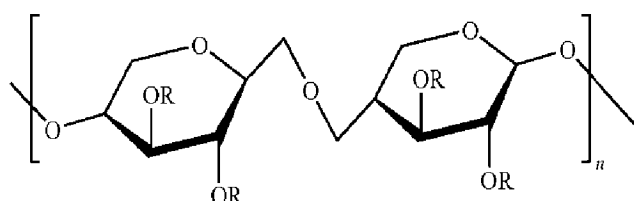
在白血球與腦膜微血管及後毛細管腦微靜脈黏附之後，認為此等細胞之一部分分別外滲至軟腦膜及血管周空間中(圖2A及B)。即使在無深度T細胞外滲存在下，白血球與血管內層內皮細胞之黏附本身可誘導CNS血管滲漏及神經症狀(諸如癲癇發作) (Fabene等人 Nat Med. 2008; 14:1377-83)。

戊聚糖聚硫酸酯(Pentosanpolysulfate, PPS; $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{21}\text{S}_4$)，亦稱為

戊聚糖聚硫酸酯(Pentosan Polysulphate)、木聚糖硫酸氫酯、木聚糖聚硫酸酯，為半合成製造之肝素樣大分子碳水化合物衍生物，其化學上及結構上類似於葡糖胺聚糖。其為白色無味粉末，在pH 6下略吸濕且可溶於水至50%。其具有4000至6000道爾頓(Dalton)之分子量。

PPS例如由Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.以名稱Elmiron[®]出售，且迄今為經美國FDA批准用於治療間質性膀胱炎(亦稱為疼痛性膀胱症候群)之唯一經口藥物。為了治療此病況，PPS係經口投與，然而，或者可將其靜脈內投與。

術語「戊聚糖聚硫酸酯(pentosanpolysulfate) (或PPS)」涵蓋半合成製造之肝素樣大分子碳水化合物衍生物。



在本發明之意義上，戊聚糖聚硫酸酯為通常在2及3位經硫酸化且有時在2位經4-O-甲基- α -D-葡糖醛酸-2,3-O-硫酸酯取代之 β 1 $\rightarrow$ 4連接木糖之線性聚合物的混合物。因此，PPS亦可命名為 β 1 $\rightarrow$ 4-D-木聚糖-2,3-雙(硫酸氫酯)。

舉例而言，半合成製造之肝素樣大分子碳水化合物衍生物(尤其諸如PPS)例如可如下產生(獲得)：其多醣主鏈木聚糖例如自山毛櫸樹之樹皮或其他植物來源提取且隨後經硫酸化試劑(諸如氯磺酸或硫醯氯及酸)處理。在硫酸化之後，PPS通常經氫氧化鈉處理以產生鈉鹽，其為較佳之本發明鹽。製造半合成製造之肝素樣大分子碳水化合物衍生物(尤其諸如PPS)的方法例如揭示於US 2,689,848或US 2010/0105889中。

在本發明之情形下，PPS較佳係向患者經口、甚至更佳靜脈內投與。

典型劑量為100、150、200或300mg，每天投與1-3次，最大量為每天600 mg。通常，日劑量在100與600 mg之間，諸如100、150、200、250、300、350、400、450、500、550或600 mg或甚至更多。舉例而言，可投與100 mg PPS 3-6次。類似地，可投與200 mg PPS 2-3次。或者，可投與300 mg PPS 2次。或者，例如100與600 mg之間(諸如100、150、200、250、300、350、400、450、500、550或600 mg)之量的PPS可在24小時內經由輸注(例如藉由使用注射泵)來投與。在後一情況下，例如100、200或300 mg之量的PPS之快速注射可先於包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法，隨後在24、48或72小時內投與100、200或300毫克/天PPS。

PPS可在投與如本文中所述包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法之前(例如預防上作為快速注射)、同時或之後投與。有利地，PPS可在將要重複或增加包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法時(例如在輸注開始或任何給藥步驟時)向患者投與。向本發明中提及之患者投與的尤其較佳之PPS為通常已知且可於市場上(例如自bene Arzneimittel GmbH)得到之戊聚糖聚硫酸酯SP54[®]。

除PPS之外，具有已知抗黏附性質的其他臨床上可得到之化合物為如本文中所述之米諾環素及那他珠單抗。雖然P-選擇素介導白血球與內皮細胞黏附之第一步驟(亦即滾動)，但後續步驟為整合素介導的。特定言之，T細胞上之LFA-1及VLA-4分別與內皮細胞上之ICAM-1及VCAM-1的相互作用在白血球與內皮細胞黏附之此第二階段期間起顯著作用。因此，因為LFA-1、VLA-4及ICAM-1屬於整合素家族及IgG超家族，所以整合素拮抗劑及IgG超家族拮抗劑為較佳之本發明化合物。

作為LFA-1之小分子抑制劑，四環素可用於人類中之臨床用途。在四

環素家族內，米諾環素為LFA-1之最佳表徵之抑制劑(Nikodemova等人 J Neuroimmunol. 2010; 219:33-7)。米諾環素在所有四環素中親脂性最大且在經口投與之後具有幾乎100%生物可用性。其亦具有大致24小時之最長活體內半衰期，此為長時間段內不間斷血清曝露之前提條件。此外，米諾環素最佳穿透至CNS中，由此使其特別適用於治療CNS病症。在臨床試驗中，米諾環素經展示可對抗多發性硬化症中之神經炎症(Zhang等人 Can J Neurol Sci. 2008; 35:185-91)且改良患有急性缺血性中風之患者中之神經結果(Lampl等人 Neurology. 2007; 69:1404-10)。在最近關於米諾環素作為中風患者之神經保護劑的確定劑量研究中，發現等效於700 mg口服的至多10 mg/kg靜脈內之日劑量持續若干天為安全且良好耐受的(Fagan等人 Stroke. 2010; 41:2283-7)。機械地，米諾環素下調T細胞上之LFA-1之表現，且充當LFA-1與ICAM-1緊緊結合所需的陽離子(諸如Ca²⁺及Mg²⁺)之螯合劑。因此，如以上所述，米諾環素為較佳之本發明化合物。

那他珠單抗為經批准用於治療多發性硬化症之抗體。其與T細胞上之VLA-4結合，從而阻斷其與內皮細胞上之VCAM-1相互作用。因此，T細胞黏附及尤其向腦中之外滲減少。因此，那他珠單抗為另一較佳之本發明化合物。

可用於或可能變得可用於人類中之臨床用途的具有所提議抗黏附性質之其他化合物之非排他性清單提供於表1中。此等化合物中之每一者均為較佳之本發明化合物，米諾環素及那他珠單抗為更佳。

結合本發明，在本文中有時亦表示為「CD3結合域(CD3 binding domain)」之「CD3特異性結合域(CD3-specific binding domain)」表徵包含構架/構架區及能夠與CD3抗原特異性相互作用之「抗原結合位點

(antigen-binding site) 」或「 抗原相互作用位點 (antigen-interaction site) 」的結合域。該結合/相互作用亦理解為定義「 特異性識別 (specific recognition) 」。根據本發明，術語「 特異性相互作用 (specifically interact/interacting) 」意謂結合域能夠與CD3抗原、較佳CD3 ϵ 抗原且更佳人類CD3 ϵ 抗原之抗原決定基結合。

如本文中所用，「CD3」表示經表示為T細胞受體複合物之一部分的分子，且具有如先前技術中通常所歸於之含義。在人類中，其以個別或獨立組合形式涵蓋所有已知CD3次單元，例如CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 及CD3 ζ 。人類CD3 ϵ 抗原以GenBank寄存編號NM_000733表示。

術語「構架(區) (framework (region))」包括抗原結合位點之骨架。舉例而言，此類骨架可由蛋白A、尤其其Z域(親和抗體)、ImmeE7 (免疫蛋白)、BPTI/APPI (Kunitz域)、Ras結合蛋白AF-6 (PDZ域)、卡律蠍毒素 (charybdotoxin) (蠍毒素 (Scorpion toxin))、CTLA-4、Min-23 (打結素)、脂質運載蛋白(抗運載蛋白)、新制癌菌素、纖維結合蛋白域、錨蛋白共同重複域或硫氧還蛋白提供(Skerra. Curr Opin Biotechnol. 2007; 18:295-304；Hosse等人 Protein Sci. 2006; 15:14-27；Nicaise等人 Protein Sci. 2004; 13:1882-91；Nygren及Uhlén. Curr Opin Struct Biol. 1997; 7:463-9)。

在本發明之情形下，較佳構架為抗體可變區之存在於抗體之可變區內較趨異(亦即高變)互補決定區(CDR)之間的技術公認之部分。該等構架區通常稱為構架1至4 (FR1、FR2、FR3及FR4)，且在三維空間中提供用於呈現六個CDR (三個來自重鏈且三個來自輕鏈)之骨架以形成抗原結合表面。

符合本發明的CD3特異性結合域之較佳實例為抗體。CD3特異性結合域可為單株或多株抗體或衍生自單株或多株抗體。術語「抗體(antibody)」包含仍保持結合特異性之衍生物或其功能片段。製造抗體之技術在此項技術中為熟知的且描述於例如Harlow及Lane「Antibodies, A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988及Harlow及Lane「Using Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999中。術語「抗體」亦包含不同類別(亦即IgA、IgG、IgM、IgD及IgE)及子類(諸如IgG1、IgG2等)之免疫球蛋白(Ig)。術語「抗體」之定義亦包括諸如以下之實施例：嵌合、單鏈、去免疫及人類化抗體以及抗體片段(尤其如Fab片段)。抗體片段或衍生物進一步包含獨立於其他V區或域與抗原或抗原決定基特異性結合的F(ab')₂、Fv、scFv片段或單域抗體、僅包含一種可變域(可為VH或VL)之單可變域抗體或免疫球蛋白單可變域；參見例如上文所引用之Harlow及Lane(1988)及(1999)。該免疫球蛋白單可變域不僅涵蓋分離之抗體單可變域多肽，而且涵蓋包含抗體單可變域多肽序列之一或多種單體的較大多肽。

雙特異性抗體形式為較佳；然而，不排除其他多特異性抗體形式(三特異性、四功能抗體等)。該CD3結合域較佳含於雙特異性單鏈抗體中或由雙特異性單鏈抗體包含。在本發明之另一較佳實施例中，該雙特異性單鏈抗體進一步包含對B細胞具有特異性、較佳對可見於B細胞淋巴瘤上之CD標記(諸如CD19、CD22、CD20或CD79a，CD19為較佳)具有特異性之結合域。在一尤其較佳實施例中，該雙特異性單鏈抗體為CD19×CD3或CD20×CD3雙特異性單鏈抗體。在一甚至更佳實施例中，該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體為蘭妥莫單抗(MT103/AMG103)。在本發明之一進一步

佳實施例中，該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含能夠與人類CD3 ϵ 之抗原決定基結合之第一結合域及能夠與人類CD19結合之第二結合域。人類CD抗原容易自公開可用之資料庫得到。人類CD19抗原例如以GenBank寄存編號AAA69966表示。

其中所揭示之所有特異性CD19×CD3雙特異性單鏈抗體(包括其變異體、片段、等效物等)均為本發明之尤其較佳CD19×CD3雙特異性單鏈抗體。

如本文中所用，「CD19×CD3雙特異性單鏈抗體(CD19×CD3 bispecific single-chain antibody)」表示包含兩種結合域之單一多肽鏈。該等雙特異性單鏈抗體在本發明之方法/給藥方案之情況下為較佳。各結合域包含至少一種來自抗體重鏈之可變區(「VH或H區」)，其中第一結合域之VH區與CD3 ϵ 特異性結合，且第二結合域之VH區與CD19特異性結合。兩種結合域視情況藉由短多肽間隔基彼此連接。多肽間隔基之非限制性實例為Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S)及其重複。各結合域可另外包含一種來自抗體輕鏈之可變區(「VL或L區」)，第一及第二結合域中每一者內之VH區及VL區經由例如EP 623679 B1中所揭示及主張之類型之多肽連接子彼此連接，但在任何情況下均足夠長以允許第一結合域之VH區及VL區與第二結合域之VH區及VL區彼此配對，以使得其一起能夠與各別第一及第二結合域特異性結合。該等CD19×CD3雙特異性單鏈抗體極詳細描述於WO 99/54440及WO 2004/106381中。

較佳地，本發明之方法/給藥方案中應用之雙特異性單鏈抗體具有域排列(a) VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)。然而，亦設想，本發明之方法可用具有諸如以下之其他域排列的CD19×CD3雙特異性單鏈抗

體進行：

- (b) VH(CD19)-VL(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)、
- (c) VL(CD19)-VH(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3)、
- (d) VH(CD19)-VL(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3)、
- (e) VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)、
- (f) VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)、
- (g) VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)、或
- (h) VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)。

本發明之方法中應用之較佳CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含：

(a) 重鏈之抗CD3 CDR，其係展示為SEQ ID NO: 11中之CD3 CDR-H1 (RYTMH)、更佳SEQ ID NO: 11 (GYTFTRYTMH)、SEQ ID NO: 12中之CD3 CDR-H2 (YINPSRGYTNYNQKFKD)及SEQ ID NO: 13中之CD3 CDR-H3 (YYDDHYCLDY)；及/或

(b) 輕鏈之抗CD3 CDR，其係展示為SEQ ID NO: 14中之CD3 CDR-L1 (RASSSVSYMN)、SEQ ID NO: 15中之CD3 CDR-L2 (DTSKVAS)及SEQ ID NO: 16中之CD3 CDR-L3 (QQWSSNPLT)；及/或

(c) 重鏈之抗CD19 CDR，其係展示為SEQ ID NO: 17中之CD19 CDR-H1 (SYWMN)、更佳SEQ ID NO: 17 (GYAFSSYWMN)、SEQ ID NO: 18中之CD19 CDR-H2 (QIWPGDGD TNYNGKFKG)及SEQ ID NO: 19中之CD19 CDR-H3 (RETTTVGRYYYAMDY)；及/或

(d) 輕鏈之抗CD19 CDR，其係展示為SEQ ID NO: 20中之CD19 CDR-L1 (KASQSV D YD GDSYLN)、SEQ ID NO: 21中之CD19 CDR-L2 (DASN LVS)及SEQ ID NO: 22中之CD19 CDR-L3 (QQSTEDPWT)。

更佳的為，本發明之方法中應用之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含重及輕鏈之CD3 CDR。甚至更佳地，本發明之方法中應用之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含重及輕鏈之CD3 CDR以及重及輕鏈之CD19 CDR。

本文中所提及之CDR係根據Kabat編號系統。Kabat編號流程為用於以一致方式對抗體之殘基進行編號的一種廣泛採納之標準(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991)。

或者，較佳的為，本發明之方法中應用之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含：

(a) SEQ ID NO: 3中所示之CD19可變重鏈(核苷酸序列展示於SEQ ID NO: 4中)；及/或

(b) SEQ ID NO: 5中所示之CD19可變輕鏈(核苷酸序列展示於SEQ ID NO: 6中)；及/或

(c) SEQ ID NO: 7中所示之CD3可變重鏈(核苷酸序列展示於SEQ ID NO: 8中)；及/或

(d) SEQ ID NO: 9中所示之CD3可變輕鏈(核苷酸序列展示於SEQ ID NO: 10中)。

更佳地，本發明之方法中應用之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含CD19可變重及輕鏈及/或CD3可變重及輕鏈。甚至更佳地，本發明之方法中應用之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含CD19可變重及輕鏈以及CD3可變重及輕鏈。

在另一替代方案中，亦較佳的為，CD19×CD3雙特異性單鏈抗體包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：

- (a) 如SEQ ID NO: 1中描繪之胺基酸序列；
- (b) 由如SEQ ID NO: 2中所示之核酸序列編碼之胺基酸序列；
- (c) 由與(b)之核酸序列具有至少70%、80%、90%、95%或99%一致性的核酸序列編碼之胺基酸序列，其中該胺基酸序列能夠與CD3及CD19特異性結合；及
- (d) 由因遺傳密碼而與(b)之核苷酸序列為簡併的核酸序列編碼之胺基酸序列，其中該胺基酸序列能夠與CD3及CD19特異性結合。

應理解，序列一致性係在整個胺基酸序列上進行測定。為進行序列比對，可使用例如程式Gap或BestFit (Needleman及Wunsch. J Mol Biol. 1970; 48:443-53；Smith及Waterman. Adv Appl Math. 1981; 2:482-9)，其含於GCG套裝軟體(Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)中。就熟習此項技術者而言，測定及鑑別與本文中所述之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體(較佳蘭妥莫單抗)之胺基酸序列具有例如70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列為一種常規方法。舉例而言，根據克里克氏擺動假設(Crick's Wobble hypothesis)，反密碼子上之5'鹼基不似其他兩種鹼基般在空間上受限，且可因此具有非標準鹼基配對。換言之：密碼子三聯體之第三位可能不同，以使得在此第三位不同之兩種三聯體可編碼相同胺基酸殘基。該假設為熟習此項技術者熟知(參見例如http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis；Crick. J Mol Biol. 1966; 19:548-55)。此外就熟習此項技術者而言，測定與本文中所述之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體之核苷酸或胺基酸序列具有例如70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的此類胺基酸序

列之細胞毒性活性為一種常規程序。與本文中所述之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體之胺基酸序列具有例如70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的CD19×CD3雙特異性單鏈抗體或抗體構築體之細胞毒性活性可藉由如例如WO 99/54440中所說明之方法來測定。

尤其較佳的為，該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體具有SEQ ID NO: 1中所示之胺基酸序列。亦尤其較佳的為如WO 99/54440中所述之CD19×CD3雙特異性單鏈抗體以及WO 2004/106381中所述之彼等CD19×CD3雙特異性單鏈抗體。蘭妥莫單抗(或AMG 103或MT103)為最佳。

本發明進一步關於一種CD19×CD3雙特異性單鏈抗體及/或一種方法，其係用於

(a) 治療人類患者之惡性CD19陽性細胞、較佳淋巴細胞、甚至更佳B細胞，及/或

(b) 向人類患者投與CD19×CD3雙特異性單鏈抗體；

其中具有抗黏附性質之化合物在用該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體治療人類患者之前、同時或之後投與，用於預防或改善該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體所導致CNS AE。

一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。

包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法(較佳CD3特異性結合域、更佳蘭妥莫單抗)、一或多種具有抗黏附性質之化合物(減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物)及/或一或多種包含以上

提及之組分中之任一者或組合的醫藥組合物之投與較佳為靜脈內投與。其可以快速注射形式或藉由連續(持續不斷)靜脈內(civ)輸注投與，連續為較佳。連續投與係指基本上無間斷之投與。「基本上無間斷」包括通常無間斷流動或空間延伸之連續投與。舉例而言，WO 2007/068354揭示一種治療方案，其以引用其的方式特定包括於本文中。在本發明之情形下設想之其他治療方案揭示於PCT/EP2010/066207中。

亦設想，患者之特徵為B/T細胞比率小於1:5（參見PCT/EP2010/066207）及/或B細胞數目少於每微升周邊血液約50個B細胞。如PCT/EP2010/066207中所極詳細揭示，若患者之特徵為B:T細胞比率小於1:5，則向該患者投與CD3特異性結合域、尤其CD19×CD3雙特異性單鏈抗體經常會併發神經症狀。然而，本文中所揭示之藉助於與一或多種具有抗黏附性質之化合物(如本發明中所定義)的合併用藥預防或改善CD3特異性結合域所導致此等神經不良作用亦適用於特徵為B:T細胞比率等於或大於1:5之患者(參見PCT/EP2010/066207)。

本發明亦關於一種(醫藥)套組或封裝，其包含「化合物」(亦即如本文中所定義減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物)及/或「包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法」(亦在本文中定義，較佳為CD3特異性結合域且最佳為蘭妥莫單抗)；及指示該化合物欲用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中之說明、標籤及/或印記。另外或替代地，該等說明、標籤及/或印記指示包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法可能會造成AE、尤其CNS AE，且因此推薦、設想或必需用減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物減輕此等作用。化合物及/或包含

針對標靶細胞重導向T細胞之療法較佳經封裝於一個密封套組或封裝中。亦設想，此套組或封裝進一步包含向患者投與內含物之裝置及/或通常用以輸注治療劑之緩衝劑、小瓶、鐵氟龍袋或輸注袋。「裝置」從而包括一或多種選自由以下組成之群的物品：用於靜脈內投藥之注射器、皮下注射針、套管、導管、輸注袋、有助於熟習此項技術者製備本發明之各別劑量及輸注之靜脈內媒劑、小瓶、緩衝劑、穩定劑、書面說明等。

以上所提及之(醫藥)套組或封裝亦可包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸。

表

表1. 可用於或可能變得可用於人類中之臨床用途的具有已知或所提議抗黏附性質之化合物

內皮細胞黏附分子(亦表示為內皮細胞上之標靶)			
標靶	化合物	作用模式	參考文獻
P-選擇素	PPS，小分子	阻斷PSGL-1結合位點	Höpfner等人 J Pharm Pharmacol. 2003; 55: 697-706
	因克拉單抗，mAb	阻斷PSGL-1結合位點	Kling等人 Thromb Res. 2013
ICAM-1	Alicaforsen 灌腸劑 (ISIS2303)，siRNA	抑制ICAM-1表現	Van Deventer等人 Aliment Pharmacol Ther. 2006; 23: 1415-25
MAdCAM	PF-00547659，mAb	阻斷β7-整合素結合位點	Pullen等人 Br J Pharmacol. 2009; 157: 281-93
VCAM-1	羅素他汀，小分子	減少VCAM-1表現	Osaka等人 Biomed Res Int. 2013
PAR-1，血纖維蛋白	凝血酶(低pM濃度)	抗-白血球黏附作	Ku及Bae. Inflamm Res.

原	下)	用，維持血管障壁完整性	2013
T細胞黏附分子(亦表示為T細胞上之標靶)			
標靶	化合物	作用模式	參考文獻
α_4 -整合素(例如VLA-4、LPAM-1)	那他珠單抗，mAb	阻斷 VCAM-1、MAdCAM、血纖維蛋白原、軟骨素結合位點	Haanstra 等人 J Immunol. 2013
	AJM300，小分子	阻斷配位體結合位點	Thomas 及 Baumgart. Inflammopharmacology. 2012; 20: 1-18
$\alpha_L\beta_2$ -整合素(LFA-1)	米諾環素	減少LFA-1表現，離子螯合劑	Nikodemova 等人 J Neuroimmunol. 2010; 219: 33-7
	SAR 1118，小分子	阻斷 ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3結合位點	Rao 等人 Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 5198-204
	BOL-303225-A，小分子	拮抗劑	Bucolo 等人 J Pharm Pharmacol. 2008; 60: 1473-9
標靶	化合物	作用模式	參考文獻
α_L -整合素(例如LFA-1)	依法珠單抗，mAb	阻斷ICAM-1結合位點	Koszik等人 J Dermatol Sci. 2010; 60: 159-66
β_7 -整合素	艾托珠單抗，mAb	阻斷 VCAM-1 及 MAdCAM結合位點	Stefanich 等人 Br J Pharmacol. 2011; 162: 1855-70
$\alpha_5\beta_1$ -整合素(VLA-5)	Natramune (PDS-2865), PureWay-C，抗壞血酸；小分子	干擾 $\alpha_5\beta_1$ -整合素介導之黏附	Weeks 等人 Med Sci Monit. 2008; 14: BR279-85；Eylar 等人 P R Health Sci J. 1996; 15: 21-6

L-選擇素	(乙醯基-)水楊酸	減少L-選擇素表現	Gerli 等人 J Immunol. 2001; 166: 832-40
整合素 (例如 LFA-1、VLA-4)	乙二胺四乙酸 (EDTA)	離子螯合劑	Welzenbach等人 J Biol Chem. 2002; 277: 10590-8
CD44	玻尿酸(HA)、硫酸軟骨素，抗 CD44 mAb	阻斷HA及E-選擇素結合位點	Murai 等人 Immunol Lett. 2004; 93: 163-70 ; Baaten 等人 Front Immunol. 2012; 3: 23
	落新婦苷、類黃酮	減少CD44表現	Yi 等人 Int Immunopharmacol. 2008; 8: 1467-74
CD162 (PSGL-1)	mAb	阻斷P-選擇素結合位點	Moore. Leuk Lymphoma. 1998; 29: 1-15
Src 家族激酶 (例如 Lck、Fyn)	PP2 (4-胺基-5-(4-氯苯基)-7-(第三丁基)吡唑并[3,4-d]嘧啶)	Src家族激酶之選擇性抑制劑	Feigelson 等人 J Biol Chem. 2001; 276: 13891-901
T細胞及/或內皮細胞上之標靶			
標靶	化合物	作用模式	參考文獻
涎酸酶	涎酸酶抑制劑，例如 栗樹精胺 (castanospermine) ；小分子	阻斷例如 LFA-1、ICAM-1之去涎酸化	Feng等人 J Leukoc Biol. 2011; 90: 313-21
黏附分子	各別黏附分子之重組配位體	競爭性阻斷天然配位體結合	
	siRNA，shRNA	減少或抑制各別黏附分子之表現	

mAb：單株抗體

表2. 新鮮分離之人類T細胞的特徵

標記	CD3	CD4	CD8	CD11a	CD49d	CD162	CD69	CD25	HLA-DR
陽性細胞之百分比±SD	93.37 ± 9.41	68.87± 4.02	25.10± 4.50	99.93± 0.06	32.90± 2.04	99.87± 0.23	1.10± 0.52	49.60± 13.85	5.03± 2.15

新鮮分離之人類T細胞表面上CD3、CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162 (PSGL-1)、CD69、CD25及HLA-DR之表現係藉由流動式細胞量測術來測定。CD3陽性細胞表示為3次獨立量測之所有事件之平均百分比±SD。CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162、CD69、CD25及HLA-DR陽性細胞表示為3次獨立量測之CD3陽性細胞之平均百分比±SD。

本發明之化合物較佳為非糖皮質激素化合物，亦即較佳排除糖皮質激素。術語「糖皮質激素(glucocorticoid)」意謂與糖皮質激素受體較佳特異性結合之化合物。該術語包括一或多種選自由以下組成之群的化合物：可的松(cortisone)、皮質醇(氫化可的松(hydrocortisone))、氯潑尼醇(cloprednol)、潑尼松(prednisone)、潑尼松龍(prednisolone)、甲基潑尼松龍(methylprednisolone)、地夫可特(deflazacort)、氟可龍(flucortolone)、曲安西龍(triamcinolone)、地塞米松(dexamethasone)、倍他米松(beatamethasone)、可的伐唑(cortivazol)、帕拉米松(paramethasone)及/或氟替卡松(fluticasone)，包括其醫藥學上可接受之衍生物。

實例

以下實例對本發明進行說明。此等實例不應理解為限制本發明之範疇。出於說明之目的實例包括在內。

實例1：在處於因CNS AE所致之蘭妥莫單抗治療中斷之高風險的患者中

藉由用PPS之抗-白血球黏附而成功減輕CNS AE

蘭妥莫單抗與PPS合併用藥之給藥方案.

在1期臨床研究中，用初始劑量為每天5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 之蘭妥莫單抗治療三名患者1週，隨後劑量遞增至每天60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 再治療3至7週。在蘭妥莫單抗之輸注開始及劑量遞增之前3小時 $\pm$ 30分鐘將相伴之PPS以100 mg快速靜脈輸注形式投與，隨後在蘭妥莫單抗之輸注開始及劑量遞增之後以每天300毫克灌注48小時。

患者109-036 (亦參見圖3E)

患者109-036為一名男性白種人，62歲，體重96.8 kg，身高178 cm，呈現I/II級濾泡性淋巴瘤。先前療法包括CHOP (02/12 - 03/04)、Dexa BEAM (03/05)、環磷醯胺(03/08)及放射線療法隨後自體幹細胞移植(03/08)。患者在連續靜脈內輸注蘭妥莫單抗57天之後達成完全反應(CR)。儘管此患者因其B:T細胞比率低而顯現CNS AE之風險高(參見PCT/EP2010/066207)，但不需要因CNS AE所致之治療中斷。

患者109-040 (亦參見圖3F)

患者109-040為一名男性白種人，51歲，體重94.0 kg，身高180 cm，呈現淋巴漿細胞性淋巴瘤(瓦爾登斯特倫病(Morbus Waldenström))。先前療法包括CVP (04/12 - 05/03)、瘤可寧(Leukeran) (05/10 - 05/12)、利妥昔單抗(Rituximab) (06/05 - 06/07)、R-CHOP (06/07 - 06/10)、Dexa BEAM (06/10)、BEAM (06/12)及放射線療法隨後自體幹細胞移植(06/12)。其他先前療法包含利妥昔單抗+苯達莫司汀(Bendamustine) (09/04 - 09/12)及利妥昔單抗(09/04 - 09/12)。患者在連續靜脈內輸注蘭妥莫單抗30天之後達成疾病穩定(SD)。儘管此患者因其B:T細胞比率低而

顯現CNS AE之風險高(參見PCT/EP2010/066207)，但不需要因CNS AE所致之治療中斷。

患者109-042 (亦參見圖3D)

患者109-042為一名女性白種人，49歲，體重92.0 kg，身高169 cm，呈現I/II級濾泡性淋巴瘤。先前療法包括R-CHOP (09/11 - 10/02)及利妥昔單抗(10/03 - 10/04)。患者在連續靜脈內輸注蘭妥莫單抗56天之後達成完全反應(CR)。儘管此患者因其B:T細胞比率低而顯現CNS AE之風險高(參見PCT/EP2010/066207)，但不需要因CNS AE所致之治療中斷。

實例2：模擬由蘭妥莫單抗或其他CD3特異性結合藥物觸發之T細胞/內皮細胞相互作用的活體外流動腔室系統

培養內皮細胞

將人類腦微血管內皮細胞(HBMEC) (編號1000，Sciencell Research Laboratories) 或人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC) (編號C-12200，Promocell)用作內皮細胞模型。首先根據製造商之說明書在Heraeus Cytoperm 2 (Thermo Scientific)中將第1代冷凍保存HBMEC ($>5 \times 10^5$ 個細胞/毫升)在37°C及5% CO₂下培養於經纖維結合蛋白塗佈之Nunclon處理75 cm²細胞培養燒瓶(編號156499，Nunc)中。用由以下組成之Detach套組(編號C-41200，Promocell)進行HBMEC之繼代培養：HEPES緩衝之平衡鹽溶液(編號C-40000，Promocell)、胰蛋白酶-EDTA溶液(0.04%/0.03%) (編號C-41000，Promocell)及胰蛋白酶中和溶液(TNS，編號C-41100，Promocell)。簡言之，自HBMEC層抽吸培養基，且用2 ml HEPES緩衝之平衡鹽溶液洗滌細胞。在室溫下添加2 ml胰蛋白酶-EDTA溶液持續1-5分鐘致使HBMEC自燒瓶底部分離。通過添加2 ml胰蛋白酶中和溶液至細胞

懸浮液中來進行胰蛋白酶-EDTA 溶液之去活化。將細胞於 Heraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific) 中以 300 g 離心 4 分鐘，且以 5×10^5 個細胞/經明膠塗佈之 75 cm² 細胞培養燒瓶(編號 L7230, Biochrom) 之細胞密度接種。將用於滾動及黏附實驗之 HBMEC 培養於補充有 Nu-Serum IV (10%) (編號 355505, BD Biosciences)、透析 FBS (10%) (編號 SZ0115, Biochrom)、MEM-維生素 (1%) (編號 K0373, Biochrom)、L-麩醯胺酸 (1%) (編號 K0283, Biochrom)、丙酮酸鈉 (1%) (編號 L0473, Biochrom)、肝素 (10 U/ml) (編號 L6510, Biochrom) 及表皮細胞生長因子 ECGS (30 µg/ml) (編號 02-102, Millipore) 之 RPMI 1640 培養基(編號 FG1215, Biochrom) 中。使用經明膠塗佈之 75 cm² 細胞培養燒瓶於補充有透析 FBS (10%) (編號 SZ0115, Biochrom) 之內皮細胞生長培養基(編號 C-22010, Promocell) 中進行 HUVEC 之培養。用 Detach 套組(編號 C-40000, Promocell) 進行 HUVEC 之繼代培養，且將細胞以 $4.0-7.5 \times 10^5$ 個細胞/75 cm² 細胞培養燒瓶之細胞密度接種。

自血液分離人類周邊血液單核細胞(PBMC)及 T 細胞

通過如別處所述之經修改密度梯度離心來進行自血液分離人類 PBMC。簡言之，將 15-20 ml 新鮮抽取之肝素化血液轉移至含有 Biocoll (編號 L6115, Biochrom) 之 Leukosep 管(編號 227290, Greiner bio-one) 中，且於 Hettich Rotanta 460 RS 型號 5606 (Hettich Laborapparate) 中以 1066 g 離心 15 分鐘。在移除血漿部分之後，將含有 PBMC 之相轉移至新管中，且用 FACS 緩衝液(D-PBS (編號 L1820), 5% FBS (編號 SO115), Biochrom) 洗滌兩次。在室溫下用溶解緩衝液(8.29 g/l NH₄Cl, 1.00 g/l KHCO₃, 0.037 g/l EDTA) 進行紅血球溶解 5 分鐘。為了後續純化未經接觸

之T細胞，根據製造商之說明書使用人類泛T細胞分離套組II（編號130-091-156，Miltenyi Biotec）。

藉由流動式細胞量測術表徵分離之人類T細胞

藉由流動式細胞量測術表徵分離之T細胞的黏附分子及活化標記之表面表現。在4℃下在冷FACS緩衝液(具有5% FBS之D-PBS)中進行FACS染色及洗滌程序。為分析表面曝露之黏附分子，用100 µl具有抗-CD11a-APC (1:10) (編號550852，BD Biosciences)、抗-CD49d-PE (1:10) (編號560972，BD Biosciences)及抗-CD162-PerCP-eFluor710 (1:20) (編號46-1629，eBioscience)之FACS緩衝液對 3×10^5 個T細胞染色。藉由用抗-CD69-PE (1:40) (編號555531，BD Biosciences)、抗-CD25-APC (1:40) (編號340907，BD Biosciences)及抗-HLA-DR-FITC (1:40) (編號555811，BD Biosciences)對 3×10^5 個T細胞進行染色來監測T細胞之可能活化。此外，在兩種染色中均包括抗-CD3-V450 (1:40) (編號560365，BD Biosciences)、抗-CD4-APC-Cy7 (1:40) (編號341115，BD Biosciences)及抗-CD8-V500 (1:40) (編號560774，BD Biosciences)以表徵T細胞亞群。用DAPI (1 µg/ml) (編號A1001.0010，Appllichem)對 3×10^5 個T細胞進行各別染色以使得監測細胞生存力。染色30分鐘，隨後用FACS緩衝液洗滌細胞兩次。使染色之樣品經受FACSCanto II儀器(BD Biosciences)之FACS分析，且使用FACSDiva軟體(BD Biosciences)進行統計分析。記錄10,000個事件，且將CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162、CD69、CD25及HLA-DR陽性細胞表示為CD3陽性細胞百分比。

用ibidi泵系統在流動條件下培養內皮細胞

使用ibidi泵系統(編號10902，ibidi)在流動條件下培養內皮細胞以及

執行人類T細胞於內皮細胞上之黏附及滾動分析。該系統由ibidi泵(編號10905, ibidi)及ibidi流體單元(編號10903, ibidi)組成, 其一起工作以於所附著載玻片(具有規定通道高度)中單向流動之產生培養基。藉由ibidi泵控制軟體(編號10908, 筆記型電腦+軟體, ibidi)控制該系統。為在流動條件下培養HBMEC或HUVEC, 分別根據製造商之說明書將HBMEC或HUVEC以 2.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度接種至 μ -載玻片I^{0.4} Luer Collagen IV(編號80172, ibidi)或 μ -載玻片I^{0.4} Luer ibiTreat(編號80176, ibidi)中, 且分別在5或10 dyn/cm²之壁剪切應力下用灌注裝置「黃/綠」(編號10964, ibidi)培養48小時。為用單一流體單元培養一個以上 μ -載玻片I^{0.4} Luer, 將多達四個 μ -載玻片用供 μ -載玻片用之串聯連接件(編號10830, ibidi)彼此連接。

為再用戊聚糖聚硫酸酯 SP54[®] (100 mg/ml 注射溶液, bene Arzneimittel GmbH)預培育HBMEC, 在任何實驗之前24小時將PPS添加至HBMEC細胞培養基(200 μ g/ml)中。在滾動及黏附實驗之前, 在37°C下用 10^{-5} M組織胺(編號H7125-1G, Sigma-Aldrich)於HBMEC細胞培養基中進行HBMEC之組織胺預刺激持續30分鐘。

用介導抗-白血球黏附之化合物培育人類T細胞

為進一步干擾AMG 103介導之黏附作用, 在滾動及黏附實驗之前, 用可能介導抗-白血球黏附之化合物預培育T細胞。因此, 將Tysabri (那他珠單抗, 20 mg/ml溶液, Elan Pharma International Ltd.)或Minocin (米諾環素, 100毫克/小瓶, Triax Pharmaceuticals)添加至T細胞懸浮液中, 且在37°C下培育。

流動條件下人類T細胞與HBMEC或HUVEC之相互作用: 用於滾動及黏附

實驗之分析設定

藉由使用新鮮分離之人類T細胞及流動培養之HBMEC或HUVEC (如上文所描述)在規定水動力流動條件下進行實驗，且用由以下組成之顯微鏡系統進行分析：倒置顯微鏡Ti-E (編號MEA53100，Nikon)、數位攝影機Orca Flash 2.8 (編號C-11440-10C，Hamamatsu)、NIS-Elements AR軟體3.22.00及4.10.03版(編號MQS31200及編號MQS31100，Nikon)、ibidi泵系統(編號10902，ibidi)、細胞培養培育箱Galaxy 14S (編號C014S-120-0000，Eppendorf)、加熱系統8 (編號10925，ibidi)及CO₂氣體培育單元I (編號10920，ibidi)。顯微鏡Ti-E配備有可使得校正等焦距變化之TI-ND6-PFS完美聚焦系統(編號MEP59390，Nikon)。用10倍物鏡(CF1 PlanFluor DL-10 X相，編號MRH20101，Nikon)監測滾動及黏附事件。將加熱系統8及CO₂氣體培育單元I在開始任何實驗之前至少3小時啟動，使將台頂培育箱預升溫至37℃及5% CO₂。亦在37℃及5% CO₂下使RPMI 1640培養基(編號FG1215，Biochrom)預升溫。就滾動及黏附實驗而言，將具有流動培養之HBMEC的μ-載玻片I^{0.4} Collagen IV或具有流動培養之HUVEC的μ-載玻片I^{0.4} ibiTreat自灌注裝置斷開，用預升溫之具有PPS (200 μg/ml)或不具有PPS之RPMI 1640培養基沖洗，且在顯微鏡下置於台頂培育箱之μ-載玻片入口中。將6×10⁶個新鮮分離之人類T細胞於PC V形管(編號347759，Nunc)中以300 g離心4分鐘。使T細胞再懸浮於具有PPS (200 μg/ml)或不具有PPS之RPMI 1640培養基中，達至最終T細胞密度為1×10⁶個細胞/毫升。將此等細胞在向細胞懸浮液中添加或不添加AMG 103 (10 ng/ml)之情況下直接用於滾動實驗，或在37℃下於PC V形管中在存在或不存在AMG 103下進一步預培育45分鐘。將該等所製備之T細胞懸浮液填

充於灌注裝置「白」(編號10963, ibidi)中, 該灌注裝置連接至流體單元與 μ -載玻片。就在1 dyn/cm²之剪切應力下T細胞於HBMEC或HUVEC上之滾動及黏附實驗而言, 應用兩種不同設定:

1. 使T細胞於內皮細胞上滾動45秒(短期條件)
2. 使T細胞於內皮細胞上滾動45-120分鐘(長期條件, 流體單元置於細胞培養培育箱中)

在流動條件下人類T細胞與HBMEC或HUVEC之相互作用: 資料擷取及分析

藉由用數位攝影機Orca Flash 2.8圖像擷取來監測T細胞與內皮細胞之相互作用, 該數位攝影機又由NIS-Elements軟體3.22.00控制。對個別時間點執行時移45秒擷取(無延遲), 每秒產生多達45幀, 解析度為1920×1440。使45秒持續時間之該等記錄圖像序列經受NIS-Elements AR 4.10.03之自動追蹤模組或經受NIS-Elements AR 3.22.00之手動追蹤。將所產生之追蹤資料輸出至Microsoft Excel, 且藉由對參數(諸如每一追蹤對象之平均進向、平均速度及路徑長度)應用過濾器進行進一步分析。隨後, 計算所有過濾之細胞的平均滾動速度 $\pm$ 標準差。在使用手動追蹤時, 選擇10-40個T細胞, 手動地追蹤, 且測定平均滾動速度 $\pm$ 標準差。

對HBMEC或HUVEC進行免疫螢光染色

在流動條件下使T細胞於HBMEC或HUVEC上滾動及黏附之後, 在4℃下使用150 μ l 4%多聚甲醛溶液(編號P-6148, Sigma-Aldrich)固定內皮細胞30分鐘。用150 μ l D-PBS沖洗 μ -載玻片, 且使其經受免疫螢光染色。首先將HBMEC在室溫下用150 μ l抗生物素蛋白阻斷試劑(編號PHA-70871, 試劑1, Dianova)阻斷10分鐘, 用150 μ l D-PBS洗滌, 隨後用150

μl生物素阻斷試劑(編號PHA-70871，試劑2，Dianova)培育。所有以下染色程序均在室溫下在暗處於150 μl具有5% FBS之D-PBS中進行，且洗滌步驟用150 μl D-PBS進行。用5 μg/ml多株兔抗-人類VCAM-1 (編號106777，abcam)培育μ-載玻片1小時。在洗滌之後，添加20 μg/ml山羊抗-兔IgG-DyLight350持續1小時，隨後用15 μg/ml小鼠抗-人類P-選擇素IgG1 (編號BBA30，R&D Systems)洗滌且培育2小時。在洗滌之後，添加山羊抗-小鼠IgG-Alexa488 (1:100) (編號A10680，Invitrogen)持續1小時。用10 μg/ml多株兔抗-人類ICAM-1生物素(編號AB7815，abcam)進行ICAM-1染色持續1小時，隨後用抗生蛋白鏈菌素-Cy3 (1:100) (編號016-160-084，Dianova)洗滌且培育1小時。如關於HBMEC所述對PFA固定之HUVEC進行ICAM-1及P-選擇素細胞表面染色。最終，使用UV光及具有PH-2相模組(編號MEH41200，Nikon)之CFI Plan Apochromat DM 20倍λ物鏡(編號MRD30205，Nikon)使HBMEC或HUVEC經受顯微鏡分析。用CFL EPI-FL Filter Block UV-2A (編號MBE41200，Nikon)監測VCAM-1染色，用CFL EPI-FL Filter Block GFP-B (編號MBE44740，Nikon)監測P-選擇素染色，且用EPI-FL Filter Block Cy3 (編號MXU96213，Nikon)監測ICAM-1染色。用NIS-Elements軟體進行圖像擷取。

統計資料分析

視所比較資料組之多少而定，將不成對t測試或單因子ANOVA與Tukey事後測試組合用以經Prism (GraphPad軟體)分析統計顯著性。P值<0.05被視為統計上顯著。

在短期條件下，在與陰性對照(-AMG 103；283±82 μm/sec)相比

時，用10 ng/ml蘭妥莫單抗(+AMG 103)預培育45分鐘之T細胞展示為 237 ± 45 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 的顯著降低之於HUVEC上平均滾動速度 $\pm\text{SD}$ 。同時，用10 ng/ml蘭妥莫單抗預培育使與HUVEC緊緊黏附之T細胞的數目增至2.6倍。另外，如與僅與未經接觸之T細胞接觸之HUVEC上的基本表現量相比，用10 ng/ml蘭妥莫單抗預培育相應T細胞時黏附分子ICAM-1及P-選擇素之表面表現增加所示，觀測到HUVEC活化。此等發現顯示經蘭妥莫單抗培育之T細胞與HUVEC的相互作用增加並緊緊黏附，從而又使此等細胞活化且增加其黏附性(圖5)。

當使用HBMEC時，在長期條件下，與陰性對照(-AMG 103； 323 ± 78 $\mu\text{m}/\text{sec}$)相比，在10 ng/ml蘭妥莫單抗(+AMG 103)存在下平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 顯著降低至 209 ± 40 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 。在向流動系統中添加蘭妥莫單抗之後45分鐘觀測到此降低，而在添加蘭妥莫單抗之後即刻(0分鐘)偵測不到T細胞滾動速度降低。與僅與未經接觸之T細胞接觸之HUVEC上的基本表現量相比，已與經蘭妥莫單抗刺激T細胞相互作用之HBMEC在T細胞滾動之後展示黏附分子ICAM-1、P-選擇素及VCAM-1之表面表現增加。此等觀測結果顯示，蘭妥莫單抗誘導之T細胞與HBMEC相互作用增加及同時HBMEC黏附性增加，其適時(亦即在45分鐘之後)與臨床研究中之T細胞再分佈時間進程相關(圖6)。

在長期條件下，如在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後45分鐘所觀測，評估PPS對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然AMG 103使於HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 自 430 ± 92 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 281 ± 96 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (+AMG 103)，但向流動系統中進一步添加PPS會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-

AMG 103, +PPS; $442 \pm 156 \mu\text{m/sec}$)所觀測的 $483 \pm 157 \mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 。在向流動系統中添加蘭妥莫單抗時，P-選擇素於HBMEC上之細胞表面表現增加，而進一步添加PPS (亦即用其預培育HBMEC)致使增加量較小。因此，藉由PPS預防T細胞與HBMEC相互作用亦使HBMEC活化及黏附性的T細胞介導之增加減少(圖7)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析PPS對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。

在長期條件下，評估PPS對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後40分鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 自 $399 \pm 153 \mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 $263 \pm 66 \mu\text{m/sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加PPS會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103, +PPS; $514 \pm 159 \mu\text{m/sec}$)所觀測的 $465 \pm 116 \mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 。因此，PPS防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖8)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析那他珠單抗對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的，將新鮮分離之T細胞在37°C下用1 $\mu\text{g/ml}$ 那他珠單抗於RPMI 1640培養基中培育10分鐘，隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估那他珠單抗對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後40分

鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自 $482\pm149\text{ }\mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 $359\pm102\text{ }\mu\text{m/sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加那他珠單抗會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+那他珠單抗； $445\pm81\text{ }\mu\text{m/sec}$)所觀測的 $444\pm110\text{ }\mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。因此，那他珠單抗防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖9)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析米諾環素對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HUVEC相互作用的干擾。為此目的，將新鮮分離之T細胞在 37°C 下用 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 米諾環素於杜爾貝科氏PBS (Dulbecco's PBS)中培育2小時，隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估米諾環素對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加 10 ng/ml 蘭妥莫單抗之後40分鐘，AMG 103使HUVEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自 $169\pm49\text{ }\mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 $127\pm41\text{ }\mu\text{m/sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加米諾環素會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+米諾環素； $233\pm29\text{ }\mu\text{m/sec}$)所觀測的 $217\pm92\text{ }\mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD(圖10)。

在另一實驗中，在長期條件下，評估米諾環素對蘭妥莫單抗誘導之與HUVEC緊緊黏附之T細胞絕對數目增加的影響。在向流動系統中添加 10 ng/ml 蘭妥莫單抗之後40分鐘，與單獨的T細胞(-AMG 103)相比，在蘭妥莫單抗(+AMG 103)存在下黏附T細胞之數目顯著增加(2.1倍)。向實驗中進一步添加米諾環素(+AMG 103，+米諾環素)會使增加之黏附T細胞數

目恢復至與在無蘭妥莫單抗存在下(-AMG 103 ; $\pm$ 米諾環素)所觀測相當或甚至更低之水準(圖11)。

因此，米諾環素防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析抗-ICAM-1抗體對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的，將HBMEC在37°C下用10 μ g/ml小鼠抗-人類ICAM-1抗體(編號MAB2146Z，Millipore)培育30分鐘，隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估抗-ICAM-1抗體對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後30分鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自407 $\pm$ 90 μ m/sec (-AMG 103)顯著降低至335 $\pm$ 48 μ m/sec (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加抗-ICAM-1抗體會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+抗-ICAM-1 Ab；378 $\pm$ 64 μ m/sec)所觀測的416 $\pm$ 97 μ m/sec之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。因此，抗-ICAM-1抗體防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖12)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析抗-P-選擇素抗體對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的，將HBMEC在37°C下用10 μ g/ml小鼠抗-人類P-選擇素抗體(編號MAB2154，Millipore)培育30分鐘，隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估抗-P-選擇素抗體對蘭妥莫單抗誘導之平均T細

胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後40分鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自 449 ± 90 $\mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 370 ± 55 $\mu\text{m/sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加抗-P-選擇素抗體會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+抗-P-選擇素Ab； 494 ± 105 $\mu\text{m/sec}$)所觀測的 440 ± 95 $\mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。因此，抗-P-選擇素抗體防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖13)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析抗-CD11a抗體對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的，將新鮮分離之T細胞在37°C下用5 $\mu\text{g/ml}$ 小鼠抗-人類CD11a抗體(編號217640，Calbiochem)於RPMI 1640培養基中培育10分鐘，隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估抗-CD11a抗體對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後10分鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自 304 ± 40 $\mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 214 ± 44 $\mu\text{m/sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加抗-CD11a抗體會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+抗-CD11a Ab； 278 ± 48 $\mu\text{m/sec}$)所觀測的 261 ± 56 $\mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。因此，抗-CD11a抗體防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖14)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述，亦使用流動系統來分析抗-CD162抗體對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的，將新鮮分離之T細胞在37°C下用10

$\mu\text{g/ml}$ 小鼠抗-人類CD162抗體(編號ab78188, abcam)於RPMI 1640培養基中培育10分鐘, 隨後進行滾動及黏附實驗。或者, 替代用抗-CD162抗體培育T細胞, 將T細胞在 37°C 下用 $10\ \mu\text{g/ml}$ 小鼠同型對照抗體(IgG1, κ ; MOPC-21; 編號M5284, Sigma-Aldrich)於RPMI 1640培養基中培育10分鐘, 隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下, 評估抗-CD162抗體對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加 $10\ \text{ng/ml}$ 蘭妥莫單抗之後45分鐘, AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 自 $539\pm149\ \mu\text{m/sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 $428\pm89\ \mu\text{m/sec}$ (+AMG 103), 但向實驗中進一步添加抗-CD162抗體會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103, +抗-CD162 Ab; $528\pm170\ \mu\text{m/sec}$)所觀測的 $637\pm191\ \mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ 。相比之下, 在AMG 103存在下添加同型對照抗體產生 $258\pm65\ \mu\text{m/sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm\text{SD}$ (+AMG 103, +小鼠IgG1, κ), 且不會如關於抗-CD162抗體所觀測般使AMG 103誘導之平均T細胞滾動速度降低恢復。因此, 抗-CD162抗體藉由選擇性干擾CD162與P-選擇素之結合而特異性防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加。此預防可能不由非特異性小鼠同型對照抗體誘導(圖15)。

如上文關於PPS與組織胺組合預刺激之HBMEC所詳細描述, 亦使用流動系統來分析重組P-選擇素對AMG 103誘導之T細胞與未經刺激之HBMEC相互作用的干擾。為此目的, 將新鮮分離之T細胞在 37°C 下用 $5\ \mu\text{g/ml}$ 重組人類P-選擇素(編號ADP3-050, R&D Systems)於RPMI 1640培養基中培育15分鐘, 隨後進行滾動及黏附實驗。

在長期條件下，評估重組P-選擇素對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在向流動系統中添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後45分鐘，AMG 103使HBMEC上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自 386 ± 77 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (-AMG 103)顯著降低至 340 ± 68 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (+AMG 103)，但向實驗中進一步添加重組P-選擇素會使此降低恢復至如亦在無AMG 103存在下(亦即-AMG 103，+重組P-選擇素； 384 ± 70 $\mu\text{m}/\text{sec}$)所觀測的 402 ± 93 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。因此，重組P-選擇素防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與內皮細胞相互作用增加(圖16)。

實例3：遵循抗-白血球黏附用於減輕CNS AE之原則的合併用藥劑量及時程

併有蘭妥莫單抗治療之靜脈內PPS合併用藥用於人類的投藥時程

患者在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之前3小時 $\pm$ 30分鐘接受100 mg PPS之快速注射。在快速注射之後即刻，藉由注射泵繼續以300毫克/天靜脈內投與PPS持續72小時。

併有蘭妥莫單抗治療之經口PPS合併用藥用於人類的投藥時程

患者在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之前7天開始，每天接受900 mg PPS，其係以每天三次每次300 mg (例如 3×100 mg)之形式經口給出。在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之後，繼續每天經口投與900 mg PPS持續72小時。

併有蘭妥莫單抗治療之靜脈內米諾環素合併用藥用於人類的投藥時程

在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之前48小時、24小時及3小時 $\pm$ 30分鐘及之後24小時、48小時及72小時，患者藉由短期靜脈內輸注接

受10 mg/kg米諾環素。

併有蘭妥莫單抗治療之經口米諾環素合併用藥用於人類的投藥時程

患者在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之前48小時、24小時及3小時±30分鐘及之後24小時、48小時及72小時每天一次經口接受700 mg米諾環素。

併有蘭妥莫單抗治療之靜脈內那他珠單抗合併用藥用於人類的投藥時程

患者在蘭妥莫單抗之輸注開始及任何給藥步驟之前24小時藉由短期靜脈內輸注接受300 mg那他珠單抗。

實例4：使用重組黏附分子之活體外流動腔室系統

塗佈重組蛋白

根據製造商之說明書將重組蛋白(rhICAM-1 (編號ADP4-050)、rhVCAM-1 (編號ADP5-050)或rhP-選擇素(編號ADP3-050)，R&D Systems)溶解於ddH₂O中。在滾動實驗之前，將重組蛋白用具有Ca²⁺及Mg²⁺之杜爾貝科氏PBS (編號L1815，Biochrom)稀釋，且在4℃下塗佈至μ-載玻片VI^{0.4} Luer ibiTreat (編號80606，ibidi)上隔夜。在使用之前，用杜爾貝科氏PBS洗滌載玻片三次，且在室溫下在所指示處用於PBS中之20% FBS (編號10270，Gibco)阻斷2小時。用不具有補充物之RPMI 1640培養基(編號FG1215，Biochrom)替換阻斷溶液。

分離及培養人類T細胞

如實例2(P53L10~P54L14)中所述自血液分離人類周邊血液單核細胞(PBMC)及T細胞且對其進行表徵。

使Jurkat E6.1 T細胞(編號88042803，歐洲細胞培養物保藏中心

(European Collection of Cell Cultures))在37℃及5% CO₂下生長於含有10% FBS (編號10270, Gibco)及青黴素/鏈黴素(編號A2213, Biochrom)之RPMI 1640培養基(編號FG1215, Biochrom)中。

在滾動實驗中，使用新鮮分離之T細胞，在實驗開始時(t=0分鐘；添加10 ng/ml蘭妥莫單抗(AMG 103))，將此等細胞再懸浮於不具有補充物之RPMI 1640培養基(編號FG1215, Biochrom)中，達至最終濃度為 1×10^6 個細胞/毫升，且在37℃及5% CO₂下培育35分鐘。隨後將細胞填充於灌注裝置「白」(編號10963, ibidi)中，該灌注裝置與流體單元與μ-載玻片連接，且如實例2(P56L18~L23)中所述在t=40分鐘、45分鐘及50分鐘記錄45秒持續時間之圖像序列。

在滾動實驗中，使用Jurkat E6.1 T細胞，將此等細胞再懸浮於不具有補充物之RPMI 1640培養基(編號FG1215, Biochrom)中，達至最終濃度為 $1.5-3 \times 10^5$ 個細胞/毫升。使Jurkat E6.1 T細胞在0.5% FBS下於RPMI 1640培養基中饑餓隔夜或於不具有補充物之RPMI 1640培養基中饑餓40分鐘，隨後添加10 ng/ml蘭妥莫單抗(AMG 103, t=0分鐘)。將細胞在37℃及5% CO₂下培育35分鐘，且隨後填充於灌注裝置「白」(編號10963, ibidi)中，該灌注裝置與流體單元及μ-載玻片連接。如實例2(P56L18~L23)中所述在t=40分鐘、45分鐘及50分鐘記錄45秒持續時間之圖像序列。

用T細胞信號轉導抑制劑培育人類T細胞

為了干擾AMG 103誘導之黏附作用，將T細胞用特異性阻斷自T細胞受體複合物信號轉導之Src激酶抑制劑預培育。為此目的，將抑制劑PP2(編號529576, Merck, 15 μM)或其媒劑對照DMSO(編號D2650,

Sigma-Aldrich)添加至T細胞懸浮液(於RPMI 1640培養基中之 1×10^6 個細胞/毫升)中，隨後在37°C及5% CO₂下培育40分鐘，隨後添加10 ng/ml蘭妥莫單抗(AMG 103，t=0分鐘)。

流動條件下人類T細胞與重組黏附分子之相互作用：用於滾動實驗之分析設定、資料擷取及分析

藉由使用新鮮分離之人類T細胞或Jurkat E6.1 T細胞在規定水動力流動條件下進行實驗，且如上文所描述用不同重組蛋白塗佈 μ -載玻片VI^{0.4} Luer ibiTreat(編號 80606，ibidi)。分析設定詳細描述於實例2(P55L13~P56L2)中。在1.1 dyn/cm²之剪切應力下進行T細胞滾動實驗。如上文所描述記錄T細胞與重組蛋白相互作用，且如實例2(P56L23~P57L3)中詳細描述分析資料。

統計資料分析

視所比較資料組之多少而定，將不成對t測試或單因子ANOVA與Tukey事後測試組合用以在Prism (GraphPad軟體)中分析統計顯著性。P值<0.05被視為統計上顯著。所有值均表示為平均值 $\pm$ SD。

在半短期條件下，在與陰性對照(-AMG 103)相比時，用10 ng/ml蘭妥莫單抗培育的新鮮分離之T細胞(+AMG 103)在t=45分鐘展示顯著降低之於重組人類ICAM-1 (以12.5 μ g/ml塗佈，具有阻斷；-AMG 103：383 $\pm$ 144 μ m/sec相對於+AMG 103：314 $\pm$ 79 μ m/sec)上、於重組人類VCAM-1 (以10 μ g/ml塗佈，具有阻斷；-AMG 103：418 $\pm$ 136 μ m/sec相對於+AMG 103：353 $\pm$ 72 μ m/sec)上、且在t=50分鐘展示顯著降低之於重組人類P-選擇素(以20 μ g/ml塗佈，具有阻斷；-AMG 103：402 $\pm$ 115 μ m/sec相對於+AMG 103：293 $\pm$ 73 μ m/sec)上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD

(圖17A-C)。

在半短期條件下，在與陰性對照(-AMG 103)相比時，用10 ng/ml蘭妥莫單抗培育之Jurkat E6.1 T細胞(+AMG 103)在t=45分鐘展示顯著降低之於重組人類ICAM-1/VCAM-1 (分別以12.5及10 μ g/ml塗佈；-AMG 103：640 $\pm$ 91 μ m/sec相對於+AMG 103：518 $\pm$ 98 μ m/sec)上及於重組人類P-選擇素(以20 μ g/ml塗佈；-AMG 103：500 $\pm$ 81 μ m/sec相對於+AMG 103：413 $\pm$ 104 μ m/sec)上之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD (圖17D、E)。

因此，就新鮮分離之T細胞與常見T細胞株而言，蘭妥莫單抗亦增加T細胞與重組人類黏附分子相互作用。

在半短期條件下，評估Src激酶抑制劑PP2對蘭妥莫單抗誘導之平均T細胞滾動速度降低的影響。雖然在添加10 ng/ml蘭妥莫單抗之後t=40分鐘，在媒劑對照DMSO存在下AMG 103將於VCAM-1塗佈之 μ -載玻片(以20 μ g/ml塗佈)上的平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD自259 $\pm$ 35 μ m/sec (-AMG 103)顯著降低至205 $\pm$ 45 μ m/sec (+AMG 103)，但在實驗中15 μ M PP2之預培育及存在使此降低恢復至256 $\pm$ 50 μ m/sec之平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD。在無AMG 103存在下PP2處理產生267 $\pm$ 66 μ m/sec之相當平均T細胞滾動速度 $\pm$ SD (-AMG 103，+PP2)。因此，Src激酶抑制劑PP2防止蘭妥莫單抗誘導之T細胞與重組人類VCAM-1相互作用增加(圖18)。

【序列表】

<110> 德商安美基研究(慕尼黑)公司
<120> 用於減輕CD3特異性結合域所導致可能不良事件之抗-白血球黏附

<130> AMG14771USP

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 498
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD19×CD3雙特異性單鏈抗體

<400> 1

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
115 120 125

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val
130 135 140

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met
145 150 155 160

Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln
165 170 175

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly
180 185 190

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
195 200 205

Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
210 215 220

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
245 250 255

Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser
260 265 270

Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
275 280 285

Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
290 295 300

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
305 310 315 320

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
325 330 335

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
340 345 350

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
385 390 395 400

Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg
405 410 415

Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly
420 425 430

Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
435 440 445

Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
450 455 460

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
465 470 475 480

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
485 490 495

Leu Lys

<210> 2
<211> 1494
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD19×CD3雙特異性單鏈抗體

<400> 2
gataatccagc tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagtatttt gaactggtac 120
caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatccaa tctagtittct 180
gggatcccac ccaggtttag tggcagtgagg tctgggacag acttcacccct caacatccat 240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
acgttcgggtg gagggacca gctcgagatc aaagggtggtg gtggttctgg cggcggcggc 360
tccggtgggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctctg gggctgagct ggtgaggcct 420
gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg 480
aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat ttggcctgga 540
gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggttaaag ccactctgac tgcagacgaa 600
tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat 660
ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc ggagggtggtg gatccgatat caaactgcag 780
cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg gcctcagtga agatgtcctg caagacttct 840
ggctacacct ttactaggta cagcatgcac tgggtaaaac agaggcctgg acagggtctg 900
gaatggattg gatacattaa tcctagccgt ggttatacta attacaatca gaagttcaag 960
gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag cctacatgca actgagcagc 1020
ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080
cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcct cagtcgaagg tggaagtgga 1140
ggttctgggtg gaagtggagg ttcagggtgga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtcctca 1200
gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacatga cctgcagagc cagttcaagt 1260
gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag tcaggcacct cccccaaaag atggatttat 1320
gacacatcca aagtggcttc tggagtccct tatcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc 1380
tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcca 1440
cagtgaggta gtaacccgct caggttcggt gctgggacca agctggagct gaaa 1494

<210> 3
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH抗CD19

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH抗CD19

<400> 4
cagggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcgaagg ctcttggtta tgcaatcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagacgggag 300
actacgacgg taggcggtta ttactatgct atggactact ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cc 372

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL抗CD19

<400> 5
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL抗CD19

<400> 6
gataaccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ccttagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggg atagttattt gaactggtac 120
caacagattc caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct 180
gggatcccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccci caacatccat 240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
acgttcgggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH抗CD3

<400> 7

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH抗CD3

<400> 8
gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaaga cttctggcta cacccttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL抗CD3

<400> 9
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 10
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL抗CD3

<400> 10
gacattcagc tgaccacgac tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gagccagttc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg ctcttgagat cccttatcgc 180
ttcagtgcca gtgggtcttg gacctcatac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cgggtgctggg 300
accaagctgg agctgaaa 318

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-H1

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-H2

<400> 12

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-H3

<400> 13

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-L1

<400> 14

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-L2

<400> 15

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD3 CDR-L3

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-H1

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-H2

<400> 18

Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-H3

<400> 19

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-L1

<400> 20
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-L2

<400> 21
Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD19 CDR-L3

<400> 22
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於減輕CD3特異性結合域所導致可能不良事件之抗-白血球黏附

【英文發明名稱】

ANTI-LEUKOCYTE ADHESION FOR THE MITIGATION OF
POTENTIAL ADVERSE EVENTS CAUSED BY CD3-SPECIFIC
BINDING DOMAINS

【中文】

本發明本質上係關於一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物，其係用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中。亦涵蓋治療具有或有風險具有包含針對標靶細胞重導向T細胞之療法所導致臨床不良事件的患者之方法。

【英文】

The present invention relates in essence to a compound which decreases or inhibits the binding of mammalian T-cells to mammalian endothelial cells for use in a method of prophylaxis and/or amelioration and/or treatment of clinical adverse events caused by therapy which comprises re-directing of T-cells against target cells in a patient. Methods of treatment of patients having or being at risk of clinical adverse events caused by therapy which comprises re-directing of T-cells against target cells are also contemplated.

【指定代表圖】

圖7A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合之化合物的用途，其用於製造預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之藥劑。

【第2項】

一種化合物之用途，其

- (a) 能夠與T細胞黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現，

且其減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合，其係用於製造預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之藥劑。

【第3項】

一種化合物之用途，其

- (a) 能夠與內皮黏附分子結合，
- (b) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
- (c) 抑制或減少內皮黏附分子之表現，

且其減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合，其係用於製造預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之藥劑。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包含針對患者之標靶細胞重導

向T細胞的該療法包括CD3結合域。

【第5項】

如請求項4之用途，其中該CD3結合域為雙特異性單鏈抗體。

【第6項】

如請求項5之用途，其中該雙特異性單鏈抗體為CD19×CD3雙特異性單鏈抗體。

【第7項】

如請求項6之用途，其中該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體為MT103/AMG103。

【第8項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的該療法包括具有嵌合抗原受體(CAR)之基因工程改造之T細胞。

【第9項】

如請求項8之用途，其中該嵌合抗原受體(CAR)包含CD19結合域。

【第10項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係在包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的該療法之初始給藥、再曝露及/或增加之前/與其相伴投與。

【第11項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該等臨床不良事件包含神經不良事件。

【第12項】

如請求項11之用途，其中該/該等神經不良事件為以下一或多者：(i) 認知病症，包含迷向/混亂及/或喚詞困難/失語；(ii)癲癇發作；(iii)部分觀測到之作為(i)或(ii)之視情況存在之前驅症狀階段之小腦症狀，包含動作性震顫、共濟失調、發音困難及手寫困難。

【第13項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該患者之特徵為B/T細胞比率小於1:5或B細胞數目少於每微升周邊血液約50個B細胞。

【第14項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該化合物為PPS、米諾環素或那他珠單抗(Natalizumab)。

【第15項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該等哺乳動物T細胞為重導向之哺乳動物T細胞。

【第16項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該等哺乳動物內皮細胞係自大血管或毛細管分離。

【第17項】

如請求項16之用途，其中該等哺乳動物內皮細胞係選自人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)或人類腦微血管內皮細胞(HBMEC)。

【第18項】

如請求項2之用途，其中該T細胞黏附分子係選自整合素(諸如 $\alpha 4$ -整合素； αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素)、選擇素(諸如L-選擇素)、CD44、CD162及/或Src家族激酶。

【第19項】

如請求項3之用途，其中該內皮黏附分子係選自選擇素(諸如E或P-選擇素)、細胞黏附分子CAM (諸如ICAM-1、MAdCAM、VCAM-1)及/或PAR-1。

【第20項】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該患者為哺乳動物，較佳為靈長類動物，最佳為人類。

【第21項】

一種鑑別用於預防及/或改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之方法中之化合物的方法，其包含：

- (a) 使該化合物與哺乳動物T細胞、哺乳動物內皮細胞、T細胞黏附分子及/或內皮黏附分子接觸；及
- (b) 評估該化合物是否：
 - (i) 減少或抑制哺乳動物T細胞與哺乳動物內皮細胞結合；
 - (ii) 能夠與T細胞黏附分子結合，
 - (iii) 能夠阻斷T細胞黏附分子之結合位點，
 - (iv) 抑制或減少T細胞黏附分子之表現，
 - (v) 能夠與內皮黏附分子結合，
 - (vi) 能夠阻斷內皮黏附分子之結合位點，及/或
 - (vii) 抑制或減少內皮黏附分子之表現。

【第22項】

如請求項21之方法，其中包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的該療法包括CD3結合域。

【第23項】

如請求項21之方法，其中包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的該療法包括具有嵌合抗原受體(CAR)之基因工程改造之T細胞。

【第24項】

如請求項21之方法，其中該化合物欲在包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的該療法之初始給藥、再曝露及/或增加之前/與其相伴投與。

【第25項】

如請求項21之方法，其中該等哺乳動物T細胞為重導向之哺乳動物T細胞。

【第26項】

如請求項21之方法，其中該等哺乳動物內皮細胞係自大血管或毛細管分離。

【第27項】

如請求項26之方法，其中該等哺乳動物內皮細胞係選自人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)或人類腦微血管內皮細胞(HBMEC)。

【第28項】

如請求項21之方法，其中該T細胞黏附分子係選自整合素(諸如 $\alpha 4$ -整合素； αL - $\beta 2$ -整合素、 αL -整合素、 $\beta 7$ -整合素)、選擇素(諸如L-選擇素)及/或CD44。

【第29項】

如請求項21之方法，其中該內皮黏附分子係選自選擇素(諸如E或P-選擇素)、細胞黏附分子CAM (諸如ICAM-1、MAdCAM、VCAM-1)及/或PAR-1。

【第30項】

一種套組，其包含如請求項1至20中任一項之用途中所定義或如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的化合物；以及CD3結合域。

【第31項】

一種套組，其包含如請求項1至20中任一項之用途中所定義或如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的化合物；以及編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸。

【第32項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至20中任一項之用途中所定義或如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的化合物；以及CD3結合域。

【第33項】

一種CD3結合域之用途，其係用於製造用於針對患者之標靶細胞重導向T細胞的藥劑，其中該患者經受包含如請求項1至20中任一項之用途中所定義或如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的該化合物之療法。

【第34項】

如請求項33之用途，其中該CD3結合域為雙特異性單鏈抗體。

【第35項】

如請求項34之用途，其中該雙特異性單鏈抗體為CD19×CD3雙特異性單鏈抗體。

【第36項】

如請求項35之用途，其中該CD19×CD3雙特異性單鏈抗體為MT103/AMG103。

【第37項】

一種編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸之用途，其係用於製造用於針對患者之標靶細胞重導向T細胞的藥劑，其中該患者經受包含如請求項1至20中任一項之用途中所定義或如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的該化合物之療法。

【第38項】

如請求項37之用途，其中該嵌合抗原受體(CAR)包含CD19結合域。

【第39項】

一種如請求項21至29中任一項之方法中所鑑別的該化合物之用途，其係用於製造預防、改善及/或治療包含針對患者之標靶細胞重導向T細胞的療法所導致臨床不良事件之藥劑。

