

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491269

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.10.22

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.06

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)

(54) ПЕРЕКЛЮЧАЕМЫЕ СРЕДСТВА ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ CAR-T ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

(31) 63/286,868

(32) 2021.12.07

(33) US

(86) PCT/US2022/081010

(87) WO 2023/107940 2023.06.15

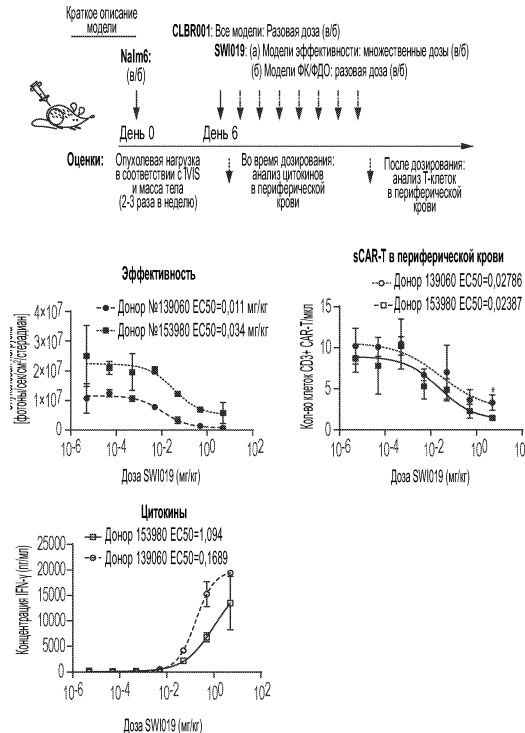
(88) 2023.07.27

(71) Заявитель:  
ЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ  
ИНСТИТЮТ (US)

(72) Изобретатель:  
Янг Трэвис, Лабрда Эдуардо (US)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложены способы лечения CD-19-положительных злокачественных новообразований у субъектов-людей с помощью подходящих доз переключаемых CAR-T-клеток и комплементарных молекул переключателей.



A1

202491269

202491269

A1

## ПЕРЕКЛЮЧАЕМЫЕ СРЕДСТВА ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ CAR-T ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0001]** Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/286868 (поданной 7 декабря 2021 г., находящейся в настоящий момент на рассмотрении). Полное раскрытие приоритетной заявки на изобретение полностью включено в настоящую заявку на изобретение путем ссылки для всех целей.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0002]** Несмотря на огромные клинические преимущества, нежелательные явления, связанные с терапией на основе CAR-T-клеток. Наиболее частые нежелательные явления представляют собой высвобождение цитокинов и синдромы нейротоксичности, ассоциированные с иммунными эффекторными клетками, вследствие неспособности модулировать уровень активности существующих продуктов на основе CAR-T-клеток после введения пациентам. Дополнительные проблемы включают токсичность, обусловленную воздействием на мишень, внеопухолевую токсичность и рецидив заболевания, опосредованный утратой антигена.

**[0003]** Для решения этих проблем была разработана «переключаемая» платформа CAR-T (sCAR-T), в которой активность sCAR-T-клеток контролируется при помощи переключателя на основе антител. Переключатель нацелен на опухолевый антиген, и sCAR распознает уникальный пептид, привитый на переключатель. Переключатель создает мостик между sCAR-T-клеткой и опухолевой клеткой, активируя sCAR-T-клетки и индуцируя уничтожение опухолевых клеток. Совместно переключатель и sCAR-T-клетки обеспечивают полное устранение опухолей в ксенотрансплантатных и сингенных моделях, но при этом каждый из них сконструирован таким образом, что не обладает отдельной активностью. Короткий период полужизни переключателя обеспечивает быструю модуляцию активности sCAR-T-клеток путем введения дозы переключателя. Кроме того, замена различных переключателей позволяет модульным образом перенаправлять sCAR-T-клетки против других опухолевых мишеней. Было

продемонстрировано, что циклическая стимуляция включения/выключения sCAR-T-клеток обеспечивает улучшенную память и персистенцию sCAR-T-клеток.

**[0004]** В данной области техники существует сильная потребность в практическом применении платформы sCAR-T при лечении субъектов-людей. Настоящее изобретение относится к удовлетворению данной и других неудовлетворенных потребностей.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0005]** В одном из аспектов изобретения предложены способы лечения, остановки роста и/или стимулирования регрессии CD19-положительного злокачественного новообразования у субъекта-человека. Эти способы включают введение указанному субъекту (а) молекулы-переключателя Т-клетки с химерным антигенным рецептором (переключателя CAR-T), содержащей Fab-антитело против CD19, которое содержит последовательность варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно, и (б) комплементарной CAR-T-клетки, содержащей последовательность CAR, представленную в SEQ ID NO: 6; с обеспечением лечения, остановки роста и/или стимуляции регрессии В-клеточного злокачественного новообразования у данного субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами реализации применяемое Fab-антитело против CD19 содержит последовательность легкой цепи и последовательность тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят одну дозу CAR-T-клеток в начале лечения и множество доз переключателя CAR-T в процессе лечения. В некоторых из этих вариантов реализации субъекту путем инфузии вводят одну дозу CAR-T-клеток с последующим одним или множеством циклов инфузии переключателя CAR-T. Каждый из циклов инфузии содержит фазу «включения» ежесуточной инфузии переключателя CAR-T в течение от около 5 до около 9 суток и фазу «выключения» без введения CAR-T в течение от около 14 до около 28 суток.

**[0006]** В различных вариантах реализации доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет около  $60 \times 10^6$ ,  $80 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $120 \times 10^6$ ,  $140 \times 10^6$ ,  $160 \times 10^6$ ,  $180 \times 10^6$ ,  $200 \times 10^6$ ,  $300 \times 10^6$ ,  $400 \times 10^6$ ,  $500 \times 10^6$ ,  $600 \times 10^6$ ,  $700 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$ ,  $900 \times 10^6$ ,  $1000 \times 10^6$  или более клеток. В некоторых вариантах реализации доза CAR-T-клеток,

вводимая субъекту, составляет от около  $0,35 \times 10^8$  до около  $14 \times 10^8$  клеток. В некоторых из этих вариантов реализации доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет от около  $1,4 \times 10^8$  до около  $7 \times 10^8$  клеток. В одном из вариантов реализации доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет около  $1,4 \times 10^8$  клеток.

**[0007]** В некоторых способах в соответствии с изобретением доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет от около 0,01 мг до около 0,1 мг на кг массы тела. В различных вариантах реализации доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, может составлять около 0,01 мг, 0,025 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,045 мг, 0,05 мг, 0,055 мг, 0,06 мг, 0,065 мг, 0,070 мг, 0,075 мг, 0,085 мг или 0,095 мг на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет от около 0,045 мг до около 0,075 мг на кг массы тела. В одном из вариантов реализации доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет около 0,06 мг на кг массы тела.

**[0008]** В некоторых способах в соответствии с изобретением CD19-положительное злокачественное новообразование у субъекта, подлежащего лечению, представляет собой CD19-положительный В-клеточный рак. В некоторых способах CD19-положительное злокачественное новообразование, которое лечат, представляет собой рецидивирующее/рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование.

**[0009]** В родственно аспекте изобретения предложены способы лечения, прекращения роста и/или стимулирования регрессии CD19-положительного рецидивирующего/рефрактерного В-клеточного злокачественного новообразования у субъекта-человека. Эти способы включают (а) введение субъекту одной дозы от около  $0,35 \times 10^8$  до около  $7 \times 10^8$  CAR-T-клеток, которые содержат последовательность CAR, представленную в SEQ ID NO:6, и затем (б) введение субъекту молекулы-переключателя CAR-T, которая представляет собой модифицированное Fab-антитело против CD19, содержащее, соответственно, последовательность легкой цепи и последовательность тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, в течение одного или более циклов инфузии, каждый из которых содержит (1) фазу "включения", составляющую от около 5 до около 9 суток, и (2) фазу "выключения", составляющую от около 14 до около 28 суток, с суточной дозой, составляющей от около 0,045 мг до около 0,075 мг CAR-T на кг массы тела, вводимой субъекту в течение фазы "включения". Предпочтительно вводимые CAR-T-клетки являются

аутологичными для субъекта. В некоторых вариантах реализации инфузионная доза CAR-T-клеток составляет около  $1,4 \times 10^8$  клеток, а суточная доза переключателя CAR-T, вводимая путем инфузии во время фазы «включения», составляет около 0,06 мг на кг массы тела. В некоторых из этих вариантов реализации фаза "включения" составляет около 7 суток, а фаза "выключения" составляет около 21 суток. В различных вариантах реализации количество циклов инфузии переключателя CAR-T может составлять 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более.

**[0010]** В некоторых из способов субъектов лечат с использованием предварительного кондиционирования путем лимфодеплеции перед введением CAR-T-клеток и молекулы-переключателя. В некоторых из этих вариантов реализации прекондиционирование, направленное на лимфодеплецию, у субъектов может быть достигнуто при помощи химиотерапии циклофосфамидом и флударабином. В различных вариантах реализации CD19-положительное рецидивирующее/рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование, которое лечат у субъекта, может представлять собой, например, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДКВКЛ (DLBCL)), фолликулярную лимфому (ФЛ (FL)), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ (CLL)), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ (SLL)), мантийноклеточную лимфому (МКЛ (MCL)), лимфому маргинальной зоны (МЗЗ (MZL)), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ (HCL)), первичную внутриглазную лимфому, лимфому Беркитта или макроглобулинемию Вальденстрема.

**[0011]** Дополнительно понять сущность и преимущества настоящего изобретения можно, обратившись к остальным частям описания и формуле изобретения.

## ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**[0012]** На Фиг. 1 показаны исследования *in vivo* с подходом, основанным на дозе, оказывающей минимальное ожидаемое биологическое действие (ДОМОБД (MABEL)), для определения дозы в первом исследовании с участием человека (ДВЧ (FH)).

**[0013]** На Фиг. 2 показаны модельные эквивалентные дозы для человека молекулы-переключателя CAR-T SWI019.

- [0014] На Фиг. 3 показано сканирование путем компьютерной томографии (КТ (СТ)), которое демонстрирует эффект лечения у пациентов
- [0015] На Фиг. 4 показано уменьшение токсичности у пациентов, которых лечат.
- [0016] Фиг. 5 представляет собой схематическую иллюстрацию исследования с увеличением дозы фазы I на основе sCAR-T. А. Дизайн исследования с увеличением дозы в фазе I. В. Обзор схемы лечения.
- [0017] Фиг. 6 демонстрирует рекомендации в отношении дозы в модели BAYDE в соответствии с индексом клинической полезности.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

- [0018] Настоящее изобретение частично основано на исследованиях, проведенных авторами настоящего изобретения, подробно описанных ниже, для определения подходящих доз переключаемой терапии на основе CAR-T у пациентов-людей. В частности, при помощи увеличения дозы в клиническом исследовании фазы I с участием людей авторы изобретения смогли определить подходящие дозы переключателя и соответствующих CAR-T-клеток специфической платформы sCAR-T, нацеленной против CD19, в лечении нескольких CD19-положительных злокачественных новообразований.
- [0019] Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы и схемы введения доз для лечения пациентов-людей, пораженных различными видами рака, например, опухолями, экспрессирующими CD19, с использованием описанных здесь платформ sCAR-T. Если не указано иное, то настоящее изобретение можно осуществить с использованием стандартных процедур, описанных, например, в *Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis*, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); патентах США № 4965343 и 5849954; Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1982); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); или *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152*, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); *Current*

Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), и Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998).

**[0020]** Следующие разделы представляют дополнительное руководство для практической реализации композиций и способов в соответствии с настоящим изобретением.

## I. Определения

**[0021]** Если иное не указано, то все используемые здесь технические и научные термины имеют то же самое значение, как обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие источники представляют специалисту в данной области техники общее определение многих терминов, используемых в настоящем изобретении: *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Morris (Ed.), Academic Press (1<sup>st</sup> ed., 1992); *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); *Encyclopaedic Dictionary of Chemistry*, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3<sup>rd</sup> ed., 2002); *Dictionary of Chemistry*, Hunt (Ed.), Routledge (1<sup>st</sup> ed., 1999); *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); *Dictionary of Organic Chemistry*, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); и *A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference)*, Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4<sup>th</sup> ed., 2000). В настоящем документе приведены дополнительные пояснения некоторых из этих терминов применительно конкретно в отношении настоящего изобретения.

**[0022]** Если из контекста не следует иное, то следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число. Также дополнительно следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, предполагается, что это утверждение служит

в качестве предваряющего основания для использования такой исключаящей терминологии, как «исключительно», «только» и т.п. в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием «отрицательного» ограничения.

**[0023]** Термин «антитело» обычно относится к полипептидной(ым) цепи(цепям), которая(ые) демонстрирует(ют) сильное одновалентное, двухвалентное или поливалентное связывание с данным антигеном, эпитопом или эпитопами. Если не указано иное, то антитела или фрагменты антител, используемые в настоящем изобретении, также охватывают определенные молекулы иммуноглобулинов или варианты антител, которые не обладают активностями специфического связывания антигенов, например, каталитические антитела. Иммуноглобулины могут иметь последовательности, полученные из любых видов позвоночных. Они могут быть получены с использованием любой подходящей технологии, например, гибридомной технологии, рибосомального дисплея, фагового дисплея, библиотек геной перетасовки, полусинтетических или полностью синтетических библиотек или их комбинаций. Если не указано иное, то термин «антитело», используемый в настоящем изобретении, включает интактные антитела, фрагменты антител и другие сконструированные антитела, которые описаны ниже или хорошо известны в данной области техники (см., например, Serafini, J Nucl. Med. 34:533-6, 1993).

**[0024]** Интактное «антитело» обычно содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи (около 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (около 25 кДа), соединенные между собой дисульфидными связями. Известные гены иммуноглобулинов, кодирующие цепи антител, включают гены константной области каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также огромное множество генов вариабельной области иммуноглобулинов. Легкие цепи подразделяют на каппа или лямбда. Тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, соответственно, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE.

**[0025]** Каждая тяжелая цепь антитела состоит из вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи большинства изотипов (подклассов) IgG состоит из трех доменов,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ , некоторые изотипы IgG, такие как IgM или IgE, содержат домен четвертой константной области,  $C_{H4}$  Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи



состоит из одного домена  $C_L$ . Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включающими различные клетки иммунной системы и первый компонент ( $C1q$ ) классической системы комплемента.

**[0026]** Области  $V_H$  и  $V_L$  антитела могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются более консервативными каркасными областями (FR). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Расположение областей CDR и FR, и система нумерации были определены, например, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1987 and 1991).

**[0027]** В настоящем документе фрагмент антитела (или антигенсвязывающий фрагмент антитела) относится к любым белкам или полипептидам, которые содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина  $V_H$ ,  $V_L$  или  $C_H$ , полученный из антитела, в окружении других компонентов, не полученных из иммуноглобулина или антитела. Такие молекулы включают (1) слитые белки  $F_c$  связывающих белков, включая рецепторы или рецепторные компоненты с полными доменами или частями доменов  $C_H$  иммуноглобулина, (2) связывающие белки, в которых домены  $V_H$  и/или  $V_L$  связаны с альтернативными молекулярными каркасами, или (3) молекулы, в которых домены  $V_H$  и/или  $V_L$ , и/или  $C_H$  иммуноглобулина объединены и/или собраны таким образом, который обычно не встречается в природных антителах или фрагментах антител, но не ограничиваются этим.

**[0028]** «Гуманизированные» формы иммуноглобулинов, отличающиеся от человеческих (например, грызунов, например, мышей или кроликов) представляют собой иммуноглобулины, которые содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, отличного от человеческого. По большей части гуманизированные иммуноглобулины представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области вида, отличного от

человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, хомяк, кролик, курица, крупный рогатый скот или не человекообразный примат, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и способностью к связыванию. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека также заменены остатками, отличные от человеческих. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации вносят для дополнительной коррекции характеристик антител. В целом, гуманизированный иммуноглобулин будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют петлям иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все или по существу все области FR представляют собой области последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированный иммуноглобулин также необязательно содержит по меньшей мере фрагмент константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно человеческого иммуноглобулина. Дополнительную информацию можно найти в Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; и Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

**[0029]** В настоящем документе предполагается, что термин «человеческий иммуноглобулин» включает иммуноглобулины, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческих иммуноглобулинов зародышевой линии. Человеческие иммуноглобулины в соответствии с изобретением могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, в настоящем документе термин «человеческий иммуноглобулин» не предназначен для включения иммуноглобулинов, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

**[0030]** Химиотерапия, направленная на лимфодеплецию (ЛД,LD) или предварительное кондиционирование, направленное на лимфодеплецию относится к

терапии, применяемой у субъектов перед инфузией CAR-T-клеток, для истощения эндогенных T-клеток (и Treg), таким образом, чтобы они не начали противодействовать/подавлять, а дали возможность осуществления экспансии/пролиферации инфузированных CAR-T-клеток. Одним из примеров предварительного кондиционирования ЛД (LD) представляет собой введение субъектам флударабина + циклофосфида (FluCy).

**[0031]** Термин «специфическое (специфичное) связывание» или «специфически (специфично) связывается с», или «специфический (специфичный) в отношении» относится к связыванию связывающего фрагмента с мишенью связывания, такому как связывание иммуноглобулина или низкомолекулярного агента с молекулой-мишенью или антигеном, например, эпитопом на конкретном полипептиде, пептиде или другой мишени (например, гликопротеиновой мишени), и означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифического взаимодействия (например, неспецифическое взаимодействие может представлять собой связывание с бычьим сывороточным альбумином или казеином). Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения связывания связывающего фрагмента (например, низкомолекулярного агента) или иммуноглобулина с молекулой-мишенью по сравнению со связыванием с контрольной молекулой. Например, специфическое связывание может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, аналогичной мишени, например, избытком немеченой мишени. В этом случае на специфическое связывание указывает конкурентное ингибирование связывания меченой мишени с зондом избытком немеченой мишени.

**[0032]** Термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с», или «специфический в отношении» конкретной молекулы-мишени или эпитопа на конкретной молекуле-мишени может демонстрироваться, например, молекулой, имеющей  $K_d$  в отношении мишени по меньшей мере около 200 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 150 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 100 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 60 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 50 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 40 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 30 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 20 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 10 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 8 нМ, в

качестве альтернативы, по меньшей мере около 6 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 4 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 2 нМ, в качестве альтернативы, по меньшей мере около 1 нМ или более. В некоторых случаях термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором связывающий фрагмент связывается с конкретной молекулой-мишенью или эпитопом на молекуле-мишени без существенного связывания с какой-либо другой молекулой или эпитопом.

**[0033]** Термин «слияние» или «слитый» используется здесь для обозначения объединения аминокислотных последовательностей различного происхождения в одной полипептидной цепи путем комбинации внутри рамки считывания их кодирующих нуклеотидных последовательностей. Термин «слияние» («слитый», «гибридный») в явном виде охватывает внутренние слияния, то есть встраивание последовательностей различного происхождения в полипептидную цепь, в дополнение к слиянию с одним из ее концов. Термин «слияние» («слитый», «гибридный») используется здесь для обозначения комбинации аминокислотных последовательностей различного происхождения.

**[0034]** Термин "эпитоп" включает любую молекулярную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином. В некоторых аспектах эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные фрагменты молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорил или сульфонил, и, в некоторых аспектах, могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или конкретные характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, с которой связывается иммуноглобулин. «Область связывания» представляет собой область на мишени связывания, с которой связывается связывающая молекула.

**[0035]** Термин «мишень» или «мишень связывания» используется в самом широком смысле и, в частности, включает полипептиды, без ограничения нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, клетки и другие молекулы с биологической функцией или без нее, существующие в природе. В некоторых конкретных вариантах реализации термин «мишень» относится к молекуле клеточной поверхности на клетке-мишени, например, опухолевой клетке.

**[0036]** Термин «антиген» относится к объекту или его фрагменту, который может связываться с иммуноглобулином или запускать клеточный иммунный ответ.

Иммуноген относится к антигену, который может вызывать иммунный ответ в организме, в частности, у животного, более конкретно, у млекопитающего, включая человека. Термин «антиген» включает области, известные как антигенные детерминанты или эпитопы, определенные выше.

**[0037]** Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или лидера секрети функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который принимает участие в секрети полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию этой последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он располагается таким образом, чтобы облегчать трансляцию. В целом «функционально связанный» означает, что соединенные последовательности ДНК расположены смежно и, в случае лидера секрети, непрерывным образом и внутри рамки считывания. Тем не менее, энхансеры не обязательно должны располагаться смежно. Связывание осуществляется путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с обычной практикой.

**[0038]** «Процентная (%) идентичность аминокислотной последовательности» в отношении последовательности пептида или полипептида, т.е. последовательности полипептида антитела scFV или идентифицированного в настоящем документе пептида-производного GCN4, определяется как процентная доля остатков аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам аминокислот в конкретной последовательности пептида или полипептида после выравнивания последовательностей и введения пробелов (гэпов), при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен, как части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей может быть осуществлено различными

способами, которые находятся в пределах компетенции данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания для изменения, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Две последовательности являются «по существу идентичными», если они имеют определенную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (*т.е.* 60% идентичность, возможно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность по определенной области или, в отсутствие указания, целой последовательности) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по окну сравнения или обозначенной области, измеренную с использованием одного из известных алгоритмов сравнения последовательностей или путем выравнивания вручную и визуальной проверки.

**[0039]** «Процесс лечения» или «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) конкретного патологического состояния или нарушения. Нуждающиеся в лечении субъекты включают субъектов, у которых уже присутствует нарушение, а также субъектов, предрасположенных к развитию нарушений, или субъектов, у которых необходимо предотвратить нарушение. Например, субъект или млекопитающее успешно «лечат» от рака, если после получения лечения в соответствии с настоящим изобретением субъект демонстрирует наблюдаемое и/или измеримое снижение или отсутствие одного или более из следующего: уменьшение количества раковых клеток или отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (*т.е.* замедление до некоторой степени и предпочтительно остановку) инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибирование (*т.е.* замедление до некоторой степени и предпочтительно остановку) метастазирования опухоли; ингибирование до некоторой степени роста опухоли; и/или облегчение до некоторой степени одного или более симптомов,

ассоциированных с конкретным раковым заболеванием; снижение заболеваемости и/или смертности и улучшение качества жизни.

**[0040]** Термин «консервативно модифицированный вариант» относится как к аминокислотным последовательностям, так и последовательностям нуклеиновых кислот. В случае конкретных последовательностей нуклеиновых кислот консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, тогда к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой конкретный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин задан одним из кодонов, этот кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой «молчащие вариации», которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариаций. В настоящем документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает все возможные молчащие вариации нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области техники будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

**[0041]** Для полипептидных последовательностей «консервативно модифицированные варианты» относятся к варианту, который имеет консервативные аминокислотные замены, аминокислотные остатки, замещенные на другие аминокислотные остатки, имеющие боковую цепь с похожим зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с похожими зарядами, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными

боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

**[0042]** Термин «приведение в контакт» имеет свое обычное значение и относится к объединению двух или более агентов (например, полипептидов или фагов), объединению агентов и клеток или объединению двух популяций различных клеток. Приведение в контакт может происходить *in vitro*, например, путем смешивания антитела и клетки или смешивания популяции антител с популяцией клеток в пробирке или среде для роста. Приведение в контакт может также происходить в клетке или *in situ*, например, приведение в контакт двух полипептидов в клетке путем совместной экспрессии в клетке рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих два полипептида, или в клеточном лизате. Приведение в контакт также может происходить *in vivo* внутри субъекта, например, путем введения агента субъекту для доставки агента в клетку-мишень.

**[0043]** Термин «субъект» в общем относится как к человеку, так и к животным, отличающимся от человека (в особенности к млекопитающим, отличающимся от человека). Если не указано иное, этот термин в связи с раскрытыми терапевтическими способами предпочтительно относится к пациентам-людям.

**[0044]** Искусственные Т-клеточные рецепторы (также известные как химерные Т-клеточные рецепторы, химерные иммунорецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR) или Т-тела) представляют собой сконструированные рецепторы, которые придают иммунной эффекторной клетке произвольную специфичность. Обычно эти рецепторы применяют для придания Т-клетке специфичности в отношении моноклонального антитела; причем перенос их кодирующей последовательности осуществляется ретровирусными или лентивирусными векторами или транспозонами. CAR-модифицированные Т-клетки (в настоящем документе также сокращенно CAR-Т-клетки или CAR<sup>+</sup> Т-клетки) представляют собой генетически модифицированные (сконструированные) Т-клетки, вооруженные химерными рецепторами, у которых



внеклеточный фрагмент распознавания состоит из домена распознавания, происходящего из антитела, и у которых внутриклеточная область происходит из одной или более фрагментов, стимулирующих лимфоциты. Структура прототипического CAR является модульной, подходящей для встраивания различных функциональных доменов и, соответственно, для создания возможности выбора специфичности и контролируемой активации Т-клеток. Предпочтительный фрагмент распознавания, происходящий из антитела, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который объединяет специфичность и связывающие остатки переменных областей как тяжелой, так и легкой цепи моноклонального антитела. Большинство обычных фрагментов активации лимфоцитов включают домен костимуляции Т-клеток (например, CD28 и/или 4-1BB) в тандеме с фрагментом активации Т-клеток (например, CD3zeta). Вооружение эффекторных лимфоцитов (таких как Т-клетки и клетки-природные киллеры) такими химерными рецепторами обеспечивает перенаправление модифицированной клетки с заранее определенной специфичностью к любому желаемому антигену-мишени без ограничения антигенами HLA. Конструкции CAR вводят *ex vivo* в Т-клетки из периферических лимфоцитов данного пациента с использованием ретровирусных или лентивирусных векторов или транспозонов. После инфузии полученных CAR-модифицированных Т-клеток обратно пациенту они перемещаются, достигают своего сайта-мишени, и при взаимодействии со своей клеткой-мишенью или тканью-мишенью они активируются и выполняют свою заданную эффекторную функцию. Терапевтические мишени для подхода на основе CAR включают раковые и ВИЧ-инфицированные клетки или аутоиммунные эффекторные клетки.

**[0045]** «Вектор» представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой полинуклеотидный сегмент для того, чтобы обеспечить репликацию присоединенного сегмента. Векторы, способные направлять экспрессию генов, кодирующих один или более одного полипептидов называются «векторами экспрессии».

**[0046]** В настоящем документе платформа sCAR-T относится к молекуле-переключателю CAR-T и комплементарной CAR-T-клетке (также называемой в настоящем документе sCAR-T-клеткой). Молекула-переключатель CAR-T («переключатель CAR-T») содержит нацеливающий фрагмент (например, антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент), который способен специфически связываться с молекулой-мишенью на поверхности клетки-мишени (например, опухолевой клетки). Переключатель CAR-T также способен связываться с CAR комплементарной CAR-T-клетки. Обычно внеклеточный домен CAR CAR-T-клетки содержит фрагмент антитела (например, scFv), которая специфически распознает домен CAR-ID (например, пептид или небольшую молекулу) в переключателе CAR-T.

## II. Переключаемые платформы CAR-T для лечения пациентов-людей

[0047] В настоящем изобретении предложены средства терапии на основе CAR-T для лечения пациентов-людей, пораженных раковыми заболеваниями, опухолям или злокачественными новообразованиями. В некоторых вариантах реализации способы предназначены для лечения или облегчения симптомов CD-19-положительного злокачественного новообразования у пациентов. В родственных вариантах реализации новые средства лечения в соответствии с настоящим изобретением направлены на стимулирование регрессии опухоли и/или на остановку роста опухоли у субъектов. В некоторых вариантах реализации субъектов, подлежащих лечению средствами лечения в соответствии с изобретением, предварительно кондиционируют с использованием химиотерапии, направленной на лимфодеплецию, или химиотерапевтической лимфодеплеции (также известной как «предварительное ЛД кондиционирование»). Это предварительное ЛД кондиционирование представляет собой важный этап до того, как субъектам можно будет на практике сделать инфузию CAR-T-клеток. Оно создает «благоприятное» окружение для размножения и выживания CAR T-клеток *in vivo*, предположительно путем элиминирования регуляторных T-клеток. Предварительное ЛД кондиционирование может приводить к повышающей регуляции иммуногенности опухоли и улучшению контроля заболевания. Продемонстрировано то, что предварительное ЛД кондиционирование стимулирует гомеостатическую пролиферацию адоптивно перенесенных T-клеток за счет увеличения способствующих выживанию/пролиферации цитокинов, интерлейкина (IL)-7 и IL-15, а и в сочетании с отсутствием конкуренции с T-клетками дикого типа. Предварительное кондиционирование с использованием химиотерапевтической лимфодеплеции перед лечением может быть легко осуществлено с помощью методов, хорошо известных в данной области техники,

например, с использованием циклофосфамидной и флударабиновой кондиционирующей химиотерапии, пример чего приведен здесь. См., например, Paplham et al., *Leuk Res Rep.* 3: 28-31, 2014; Bot et al., *Blood* 126: 4426, 2015; Hirayama et al., *Blood* 133: 1876-1887, 2019; Hay and Turtle, *Drugs* 77: 237-245, 2017; и Yakoub-Agha et al., *Haematologica.* 105: 297-316, 2020.

**[0048]** Обычно субъектам, которых лечат (необязательно после проведения химиотерапевтической ЛД), вводят переключаемую платформу CAR-T-клеток (sCAR-T), которая выполнена с возможностью лечения конкретного рака, которым поражен субъект, например, CD19-положительного В-клеточного злокачественного новообразования. Переключаемая CAR-T-клеточная платформа содержит (а) переключатель CAR-T (также называемый в настоящем документе молекулой-переключателем CAR-T, включая пептид-переключатель CAR-T или соединение-переключатель CAR-T), который может связываться с CAR CAR-T-клетки, а также специфически нацелен на молекулу клеточной поверхности на опухолевой клетке, и (б) комплементарную CAR-T-клетку, которая содержит CAR, с которым может связываться переключатель. При лечении субъектов-людей вводимый переключатель CAR-T и комплементарные CAR-T-клетки предпочтительно являются человеческими или гуманизированными. Например, CAR может представлять собой гуманизированный полипептид, а Т-клетка, в которой должен экспрессироваться CAR, может представлять собой человеческие клетки. В соответствии с некоторым из этих вариантов реализации Т-клетки, экспрессирующие гуманизированный CAR, представляют собой аутологичные Т-клетки, выделенные у конкретного субъекта-человека, которого лечат. В целом, введение осуществляется в соответствии со стандартными протоколами иммунотерапии или более подробным приведенным здесь руководством. В некоторых предпочтительных вариантах реализации переключатель CAR-T и комплементарные CAR-T-клетки вводят субъекту путем инфузии. В некоторых вариантах реализации описанные здесь способы лечения sCAR-T могут быть использованы в комбинации с другими известными способами лечения или терапевтическими агентами для лечения видов рака, например, химиотерапией, гормональной терапией, лучевой терапией или хирургическим вмешательством.

**[0049]** В некоторых способах субъекту, которого лечат, можно вводить более чем один переключатель CAR-T вместе с комплементарными CAR-T-клетками, которые

нацелены против различных поверхностных молекул на опухолевой клетке. В соответствии с некоторым предпочтительным вариантам осуществления изобретения различные молекулы-переключатели CAR-T содержат один и тот же домен CAR-ID, что позволяет различным переключателям взаимодействовать с одной и той же комплементарной CAR-T-клеткой. Такое лечение особенно полезно для гетерогенных опухолей. Например, субъектов, пораженных лейкозами и лимфомами, можно лечить фармацевтической композицией, которая содержит (а) нацеленный на CD19 переключатель CAR-T вместе с нацеленным на CD20 или CD22 переключателем, и (б) комплементарные CAR-T-клетки. В этих вариантах реализации CAR-T-переключатели можно вводить последовательно или одновременно. Второй переключатель, нацеленный на вторую молекулу клеточной поверхности на клетке-мишени, может быть введен после понижающей регуляции первой молекулы клеточной поверхности на клетке-мишени, на которую нацелен первый переключатель.

**[0050]** В связанном аспекте способы в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в общем для приживания или размножения CAR-T-клеток у субъекта. Как правило, субъект представляет собой субъекта с заболеванием или состоянием (например, раком), для лечения которого предназначены CAR-T-клетки. В этих способах субъекту вводят (а) переключатель CAR-T, который содержит (1) домен, взаимодействующий с химерным антигенным рецептором (CAR-ID), и (2) нацеливающий фрагмент, специфичный в отношении молекулы, характерной для заболевания или состояния, которым поражен субъект (например, молекула поверхности опухолевой клетки), и (б) комплементарную CAR-T-клетку, которая имеет во внеклеточном домене своего CAR одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с CAR-ID.

**[0051]** Обычно переключаемая платформа CAR-T-клеток, которая будет использоваться в способах в соответствии с настоящим изобретением, содержит одну или более молекул-переключателей CAR-T и одну или более комплементарных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения вводят один или более переключателей, комплементарных в отношении одной CAR-T-клетки. Обычно переключатель CAR-T для введения субъекту содержит домен, взаимодействующий с химерным антигенным рецептором (CAR-ID), и нацеливающий

домен или нацеливающий фрагмент. CAR-ID специфически связывается с внеклеточным доменом CAR на комплементарной CAR-T-клетке. CAR-ID переключателей CAR-T может представлять собой любое вещество, которое может быть слито, конъюгировано или иным образом присоединено к описанному в настоящем документе нацеливающему фрагменту (например, антителу против CD19 или его антигенсвязывающему фрагменту), при условии, что CAR-ID может быть связан CAR-рецептором CAR-T-клеток. Например, CAR-ID может представлять собой CAR-связывающий белок, CAR-связывающий пептид, CAR-связывающую небольшую молекулу. В некоторых предпочтительных вариантах реализации CAR-ID содержит пептид фактора транскрипции дрожжей GCN4 или его производное, или его гомолог. См., например, Hinnebusch and Fink, Proc Natl Acad Sci USA 80:5374-8, 1983; Arndt et al., Proc Natl Acad Sci USA 83: 8516-20, 1986; WO2015057834 и WO2015057852. В соответствии с некоторыми из этих вариантов реализации пептид фактора транскрипции дрожжей GCN4 содержит последовательность или эпитоп пептида GCN4(7P14P), как описано в Berger et al. FEBS Letters 450: 149-153, 199; и Zahnd, C., et al., J. Biol. Chem. 279: 18870-18877, 2004. В качестве примера, пептид-производной GCN4 в CAR-ID, может содержать последовательность NYHLENEVARLKKL (SEQ ID NO:1) или RMKQLEPKVEELLPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER (SEQ ID NO:13).

**[0052]** Нацеливающий фрагмент применяемого переключателя CAR-T может связываться с любой молекулой-мишенью, которая присутствует на поверхности опухолевой клетки-мишени, например, CD19, как описано здесь в качестве примера. Предпочтительно молекула-мишень может содержать антиген. В различных реализации молекула-мишень может представлять собой белок, липидный фрагмент, гликопротеин, гликолипид, углевод, полисахарид, нуклеиновую кислоту, ГКГ (МНС) (главный комплекс гистосовместимости)-связанный пептид или их комбинацию. В некоторых предпочтительных вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой нацеливающий полипептид, такой как нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab, как приведено здесь в качестве примера). Нацеливающее антитело может представлять собой человеческое, полностью человеческое, гуманизованное, сконструированное человеческое, нечеловеческое и/или химерное антитело. В некоторых вариантах реализации

антитело, отличающееся от человеческого, используемое в переключателе CAR-T, может быть гуманизировано для уменьшения иммуногенности в отношении людей при сохранении специфичности и аффинности родительского антитела, отличающегося от человеческого. При лечении пациентов-людей нацеливающее антитело предпочтительно представляет собой гуманизированное или человеческое антитело. В различных вариантах реализации нацеливающее антитело может специфически связываться с различными молекулами-мишенями на опухолевых клетках, например, CD19, Her2, CLL1, CD33, CD123, EGFR, EGFRvIII, CD20, CD22, CS1, BCMA, SEA или их фрагментом.

**[0053]** В некоторых предпочтительных вариантах реализации нацеливающий фрагмент переключателя CAR-T представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который содержит гуманизированные последовательности тяжелой и/или легкой цепи. Некоторые конкретные примеры нацеленных на опухоль переключателей CAR-T, которые могут быть использованы и/или гуманизированы для применения в способах в соответствии с настоящим изобретением, описаны, например, в PCT/US2017/057460, PCT/US2014/060713, PCT/US2014/060684, PCT/US2016/024524, PCT/US2016/027997 и PCT/US2016/027990.

**[0054]** В некоторых вариантах реализации CAR-ID и нацеливающий фрагмент слиты друг с другом. В некоторых из этих вариантов реализации структурный компонент (например, конец пептида) CAR-ID присоединен или связан с концом фрагмента, нацеленного на полипептид (например, гуманизированного антитела против CD19 или его антигенсвязывающего фрагмента). В некоторых вариантах реализации CAR-ID и нацеливающий фрагмент слиты друг с другом при помощи линкера. В некоторых вариантах реализации CAR-ID присоединен к нацеливающему фрагменту сайт-специфическим образом. Сайт-специфическое присоединение может включать присоединение CAR-ID к заданному сайту на нацеливающем фрагменте, например, N-концу легкой цепи нацеливающего антитела, как в молекуле-переключателе, описанной здесь в качестве примера. В некоторых вариантах реализации сайт-специфическое присоединение может включать присоединение CAR-ID к неприродной аминокислоте в нацеливающем фрагменте. В качестве конкретного примера переключатель CAR-T, используемый в способах в соответствии с изобретением, представляет собой молекулу SWI019, нацеленную против CD19. Это

модифицированное Fab-антитело, которое содержит происходящий из GCN4 пептид NYHLENEVARLKKL (SEQ ID NO:1), слитый через линкер GGGGS (SEQ ID NO:14) с N-концом легкой цепи гуманизированной молекулы Fab против CD19. Полученная в результате последовательность варибельной области легкой цепи молекулы Fab, слитая с пептидом GCN, продемонстрирована в SEQ ID NO:2. Наряду с этой последовательностью легкой цепи переключатель SWI019 (модифицированная молекула Fab) также имеет последовательности варибельной области тяжелой цепи, продемонстрированные в SEQ ID NO: 3. Включающие константные области последовательности легкой цепи и тяжелой цепи SWI019 показаны, в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно. Более подробная информация о структуре этого переключателя CAR-T описана, например, в патенте США № 11174306; и *Rodgers DT, et al.*, PNAS, 2016;113(4):E459-68.

**[0055]** Наряду с переключателем CAR-T субъекту также вводят комплементарную CAR-T-клетку для лечения рака. Обычно CAR-T-клетки содержат химерный антигенный рецептор (XAR, CAR), который содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Внеклеточный домен способен специфически связываться с CAR-ID (например, пептидом GCN4, Flag, K4 или E4 или небольшой молекулой, такой как флуоресцеин изотиоцианат (FITC) используемого переключателя CAR-T. В некоторых предпочтительных вариантах реализации внеклеточный домен CAR содержит антитело или фрагмент антитела (например, scFv), который связывается с CAR-ID переключателя. Антитело может быть человеческим, полностью человеческим, гуманизированным, модифицированным человеческим, нечеловеческим и/или химерным антителом. Для лечения пациентов-людей антитело в CAR CAR-T-клетки предпочтительно является человеческим или гуманизированным. Множество известных трансмембранных доменов белка можно использовать в CAR CAR-T-клеток. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD8 или CD28. Как правило, внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальные домены, такие как CD3 $\zeta$ , FcR- $\gamma$  и Syk-PT, а также косигнальные домены, такие как CD28, 4-1BB и CD134. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать (а) домен CD3-дзета, плюс (б) домен CD28, домен 4-1BB или как домен CD28, так и домен 4-1BB. В

некоторых вариантах реализации шарнирная область присутствует в CAR для соединения внеклеточного домена с трансмембранным доменом.

**[0056]** В зависимости от CAR-ID в используемом переключателе CAR-T во внеклеточных доменах комплементарных CAR-T-клеток могут присутствовать различные фрагменты, связывающие CAR-ID. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен CAR может содержать антитело или фрагмент антитела, который распознает фактор транскрипции дрожжей GCN4 или его фрагмент. См., например, Rodgers et al., Proc Natl Acad Sci USA 113:E459-E468, 2016. В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен CAR CAR-T-клеток может содержать антитело против флуоресцеина изотиоцианата (FITC) или его фрагмента, связывающего FITC. Антитело против FITC может представлять собой scFv против FITC. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен CAR CAR-T-клеток может содержать антитело или фрагмент, который распознает синтетический (не встречающийся в природе) пептид. Например, антитело в CAR может представлять собой антитело, которое специфически распознает метку FLAG<sup>®</sup> или ее фрагмент. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен CAR может содержать антитело против НТР или его фрагмент.

**[0057]** При лечении субъекта-человека CAR вводимых CAR-T-клеток предпочтительно должен быть человеческим или гуманизированным для снижения иммуногенности в отношении людей. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен CAR вводимых CAR-T-клеток содержит гуманизированный scFv, который связывается с CAR-ID вводимого совместно с ними переключателя. Гуманизированный scFv может содержать гуманизированную последовательность VH (вариабельной тяжелой цепи) с нечеловеческими (например, мышинными) CDR, привитыми на каркасную область человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен CAR может содержать гуманизированный scFv против GCN4. Такие молекулы scFv могут происходить из клона 52SR4 scFv против GCN4, описанного в Zahnd et al., J. Biol. Chem. 279:18870-77, 2004. Гуманизированный scFv против GCN4 (например, гуманизированный вариант клона 52SR4) может содержать гуманизированную легкую цепь, гуманизированную тяжелую цепь или гуманизированную легкую цепь и гуманизированную тяжелую цепь. Гуманизированное антитело против GCN4 (например, гуманизированный



вариант клона 52SR4) может содержать гуманизованную последовательность VH (вариабельной тяжелой цепи) с не человеческими (например, мышинными) CDR, трансплантированными в каркасную область человеческого иммуноглобулина. Конкретный пример таких гуманизованных молекул scFv анти-GCN4, которые могут быть использованы в CAR-T-клетках согласно изобретению, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, как в sCAR-T-клетке, приведенной в качестве примера в настоящем документе.

**[0058]** Комплементарные и инертные CAR-T-клетки, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены в соответствии с методами, хорошо известными в данной области техники, или конкретными протоколами, примерами которых являются, например, WO2018/075807, WO2015057834, WO2015057852 и Marcu-Malina et al., *Expert Opinion on Biological Therapy*, Vol. 9, No. 5. Обычно рекомбинантная технология может быть использована для введения кодирующего CAR генетического материала в любые подходящие Т-клетки, например, человеческие Т-клетки, такие как Т-клетки центральной памяти. В качестве примера CAR-T-клетки, которые будут использоваться в способах в соответствии с изобретением, могут быть получены путем трансдукции Т-клеток человека лентивирусным вектором, экспрессирующим сконструированный CAR (например, гуманизованный CAR). В данной области техники известно множество гуманизованных последовательностей CAR и CAR-T-клеток, несущих такие гуманизованные последовательности CAR. Все они могут быть легко использованы и/или адаптированы для применения в способах в соответствии с изобретением. См., например, WO2018/075807; Li et al., *Biomarker Research* 8: 36, 2020; и Maude et al., *Blood* 128: 217, 2016.

**[0059]** В качестве конкретного примера переключатель CAR-T, который будет использоваться в способах в соответствии с настоящим изобретением может содержать гуманизованное антитело против CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab), слитый с пептидом GCN4. Гуманизованное антитело против CD19 может содержать последовательность вариабельной области легкой цепи и последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которые идентичны или по существу идентичны (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно. CAR-ID пептида GCN4 может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или по существу идентичную

(например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 1, и слитую с антителом против CD19 по N-концу легкой цепи. Комплементарные CAR-T-клетки, которые будут использоваться вместе с этим переключателем CAR-T, содержат в своем внеклеточном домене гуманизированное антитело против GCN4 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv). Последовательность вариабельной области легкой цепи и последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против GCN4 продемонстрированы, соответственно, в SEQ ID NO: 4 и 5. Специфическая молекула scFv против GCN4, которая имеет эти две последовательности вариабельных областей, соединенные линкером GS, показана в SEQ ID NO: 7. В этом CAR присутствует шарнирная область (SEQ ID NO: 8) для соединения C-конца scFv с N-концом трансмембранного домена (SEQ ID NO: 9). Внутриклеточный домен CAR содержит от N-конца к C-концу домен CD28 (SEQ ID NO: 10), домен 4-1BB (SEQ ID NO: 11) и домен CD3-зета (SEQ ID NO: 12). Аминокислотная последовательность полноразмерной молекулы CAR показана в SEQ ID NO: 6. Синтез и продукция этого CD-19, нацеленного на гуманизированный переключатель CAR-T, и комплементарные CAR-T-клетки, описаны в данной области техники. См., например, WO2018/075807. Также известно множество других гуманизированных переключателей CAR-T и комплементарные CAR-T-клетки, подходящие для применения в способах в соответствии с данным изобретением. См., например, WO2018/075807; и Viaud et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115: E10898-E10906, 2018.

**[0060]** SEQ ID NO:2 (гуманизированная вариабельная область легкой цепи антитела против CD19 с N-концевым слитым пептидом GCN4)

NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISKYLNWYQ  
QKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLP  
YTFGQGTKLEIK

**[0061]** SEQ ID NO:3 (гуманизированная вариабельная область тяжелой цепи антитела против CD19)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGSETT  
YYNSALKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWG  
QGTLVTVSS

**[0062]** SEQ ID NO:4 (гуманизированная переменная область легкой цепи антитела против GCN4)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNR  
APGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDG

**[0063]** SEQ ID NO:5 (гуманизированная переменная область тяжелой цепи антитела против GCN4)

QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGI  
TDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLKMSSLDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLTV  
SS

**[0064]** SEQ ID NO:6 (полноразмерная последовательность гуманизированного CAR)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNR  
APGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVR  
QPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLKMSSLDADTARYY  
CVTGLFDYWGQGTTLTVSSESKYGPPCPPDFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF  
WVRSKRRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFK  
QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**[0065]** SEQ ID NO:7 (гуманизированное scFv против GCN4 )

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNR  
APGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVR  
QPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLKMSSLDADTARYY  
CVTGLFDYWGQGTTLTVSS

**[0066]** SEQ ID NO:8 (шарнир гуманизированного CAR)

ESKYGPPCPPCPD

**[0067]** SEQ ID NO:9 (трансмембранный домен гуманизированного CAR)

FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

**[0068]** SEQ ID NO:10 (домен CD28 внутриклеточного домена гуманизированного CAR)

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0069] SEQ ID NO:11 (домен 4-1 BB внутриклеточного домена гуманизированного CAR)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0070] SEQ ID NO:12 (домен CD3-зета внутриклеточного домена гуманизированного CAR)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNP  
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
LPPR

[0071] SEQ ID NO:15 (полноразмерная последовательность легкой цепи переключателя CAR-T Fab SWI019)

NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQ  
QKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQQGATLP  
YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

[0072] SEQ ID NO:16 (полноразмерная последовательность тяжелой цепи переключателя CAR-T Fab SWI019 )

QVQLQESGPGGLVKPSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGSETT  
YYNSALKSRLTISKDNSKNQVSLKMSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWG  
QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

### III. Виды рака \_\_\_\_\_ человека, подлежащие лечению

[0073] Способы в соответствии с изобретением относятся к лечению рака человека путем направления sCAR-T-клеток к опухолевым клеткам у субъекта-человека, несущего одну или более специфических молекул-мишеней (например, CD19), которые распознаются вводимыми совместно с ними переключателями CAR-T. Переключатели могут взаимодействовать с множеством клеток-мишеней, которые экспрессируют одни и те же (например, CD19) или разные молекулы-мишени (например, CD19 и CD20). В некоторых способах молекула поверхности раковой клетки, на которую должна быть нацелена платформа sCAR-T в соответствии с

изобретением, представляет собой рецептор. Рецептор может представлять собой внеклеточный рецептор. Рецептор может представлять собой рецептор клеточной поверхности. В качестве не ограничивающего объем изобретения примера, рецептор может связывать гормон, нейромедиатор, цитокин, фактор роста или молекулу распознавания клеток. Рецептор может представлять собой трансмембранный рецептор. Рецептор может представлять собой рецептор, связанный с ферментом. Рецептор может представлять собой рецептор, связанный с G-белком (GPCR). Рецептор может представлять собой рецептор фактора роста. Молекула клеточной поверхности может представлять собой нерцепторный белок клеточной поверхности. Молекула-мишень может представлять собой кластер белков дифференцировки. В качестве не ограничивающего объем изобретения примера молекула клеточной поверхности может быть выбрана из CD19, CD20, CD34, CD31, CD117, CD45, CD11b, CD15, CD24, CD114, CD182, CD14, CD11a, CD91, CD16, CD3, CD4, CD25, CD8, CD38, CD22, CD61, CD56, CD30, CD13, CLL1, CD33, CD123 или их фрагментов или гомологов. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами реализации молекула-мишень представляет собой CD19, как приведено здесь в качестве примера.

**[0074]** Способами согласно настоящему изобретению можно лечить различные виды рака. В некоторых вариантах реализации рак, который лечат, является гетерогенным. В некоторых вариантах реализации рак, который лечат, представляет собой злокачественное новообразование клеток крови. Например, рак, который лечат, может происходить из клеток костного мозга или других клеток крови. В этих вариантах реализации рак может происходить из В-клетки, Т-клетки, моноцита, тромбоцита, лейкоцита, нейтрофила, эозинофила, базофила, лимфоцита, гемопоэтической стволовой клетки или предшественника эндотелиальных клеток. В некоторых вариантах реализации рак, который лечат, представляет собой рецидивирующие, рефрактерные В-клеточные злокачественные новообразования. В некоторых предпочтительных вариантах реализации рак, который лечат, является производным CD19-положительного В-лимфоцита. В некоторых вариантах реализации рак может происходить из стволовой клетки. Например, нацеливающая раковая клетка может происходить из плюрипотентной клетки. В некоторых вариантах реализации раковая клетка, являющаяся мишенью, может происходить из

одной или более чем одной эндокринной железы. Эндокринная железа может представлять собой лимфатическую железу, гипофиз, щитовидную железу, паращитовидную железу, поджелудочную железу, половую железу или шишковидную железу.

**[0075]** В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами реализации способы в соответствии с изобретением направлены на лечение субъектов, с рецидивирующими/рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями, которые ранее получали лечение. Такие заболевания и состояния хорошо известны в данной области техники. См., например, Swerdlow et al., WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: *World Health Organization Classification of Tumours*, Lyon, France: IARC, Revised 4th Edition (2017); и Swerdlow et al., *Blood* 2016, 127(20):2375-90. В соответствии с различными вариантами осуществления изобретения эти субъекты могут представлять собой субъектов, страдающих от различных форм В-клеточной лимфомы, включающих неклассифицируемую, с признаками, промежуточными между диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДКВКЛ (DLBCL)) и классической лимфомой Ходжкина. Они включают, например, ДКВКЛ (DLBCL), не установленную иным образом (НУИО (NOS)), ДКВКЛ (DLBCL), ассоциированную с хроническим воспалением, В-клетки зародышевого центра, тип активированных В-клеток, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ (CLL))/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ (SLL)), трансформацию фолликулярной лимфомы (ФЛ (FL)) или другие невыраженные гистологии при ДКВКЛ (DLBCL), ХЛЛ (CLL) с трансформацией Рихтера, лимфому маргинальной зоны селезенки, В-клеточную лимфому селезенки/лейкоз, неклассифицируемую (диффузную мелкоклеточную В-клеточную лимфому селезенки с красной пульпой и вариант волосатоклеточного лейкоза), экстранодальную лимфому маргинальной зоны ассоциированную с слизистой оболочкой лимфоидной ткани (лимфома АСОЛТ (MALT)), лимфомы узловой маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы (МКЛ (MCL)), включая новообразование мантийных клеток *in situ*, фолликулярную лимфому (ФЛ (FL)) (включая фолликулярное новообразование *in situ* и фолликулярную лимфому двенадцатиперстной кишки), крупноклеточную В-клеточную лимфому с перестройкой

IRF4, первичную лимфому кожного центра фолликула и вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ (EBV))+ ДКВКЛ (DLBCL) (НУИО (NOS)) (включая ВЭБ (EBV)+ ДКВКЛ (DLBCL)). Подходящие опухоли, подлежащие лечению способами в соответствии с данным изобретением, также включают различную первичную медиастинальную (тимусную) крупноклеточную В-клеточную лимфому. Они включают, например, ALK+ крупноклеточную В-клеточную лимфому, HHV8+ДКВКЛ (DLBCL) (НУИО (NOS)), В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перестройками MYC и BCL2, и/или BCL6, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности (НУИО (NOS)), лимфому Беркитта и лимфоплазмочитарную лимфому (ЛПЛ (LPL)) (включая макроглобулинемию Вальденстрема (МВ (WM))).

**[0076]** Некоторые способы в соответствии с изобретением направлены на лечение лейкоза, например, CD-19-положительного лейкоза. Конкретные примеры лейкозов включают миелогенный лейкоз, лимфобластный лейкоз, миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, нейтрофильный лейкоз, миелодиспластический синдром, В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, крупноклеточную лимфому, смешанно-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина, рецидивирующую мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, множественную миелому, базофильный лейкоз, эозинофильный лейкоз, мегакариобластный лейкоз, монобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, эритролейкоз, эритроидный лейкоз и гепатоцеллюлярную карциному. В некоторых вариантах осуществления изобретения нарушение, которое лечат, представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах реализации нарушение, которое лечат, представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах реализации нарушение, которое лечат, представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах реализации нарушение, которое лечат, представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах реализации нарушение, которое лечат, представляет собой CD19-положительную лимфому Беркитта.

**[0077]** В некоторых предпочтительных вариантах реализации рак, который лечат, представляет собой CD19-положительную опухоль или злокачественное

новообразование. В некоторых из этих вариантов реализации рак, который лечат, представляет собой В-клеточный рак или В-клеточное злокачественное новообразование. В-клеточный рак или В-клеточное злокачественное новообразование охватывают В-клеточные лимфомы, которые составляют основную долю неходжкинских лимфом (НХЛ (NHL)). Примеры этих видов В-клеточного рака включают, например, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДКВКЛ (DLBCL)), фолликулярную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ (CLL)), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ (SLL)), мантийноклеточную лимфому (МКЛ (MCL)), лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфоплазмоцитарную лимфому (макроглобулинемию Вальденстрема), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ (HCL)), первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС (CNS)) и первичную внутриглазную лимфому.

#### IV. Введение и дозы

**[0078]** При практической реализации описанных здесь способов лечения рака человека, субъектам, нуждающимся в лечении, вводят фармацевтическую композицию, которая содержит терапевтически эффективное количество описанной здесь платформы sCAR-T. Как описано в настоящем документе, терапевтически эффективное количество также должно быть оптимальным для того, чтобы субъекты, получающие схему введения доз, не испытывали неприемлемой токсичности. В дополнение к платформе sCAR-T композиция может содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей или агентов, например, солей, эксципиентов или разбавителей. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Он может представлять собой один или более совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей, других эксципиентов или инкапсулирующих веществ, которые подходят для введения человеку или ветеринарному пациенту (например, физиологически приемлемый носитель или фармакологически приемлемый носитель). Введение платформы sCAR-T может осуществляться в любом порядке. Например, в некоторых вариантах реализации sCAR-T-клетки можно вводить одновременно с введением переключателя CAR-T. В некоторых других способах переключатель CAR-T можно вводить до



введения sCAR-T-клеток. В некоторых предпочтительных вариантах реализации sCAR-T-клетки вводят до введения переключателя CAR-T, как приведено здесь в качестве примера.

**[0079]** Общие руководства по приготовлению и введению терапевтических композиций в соответствии с изобретением описаны в данной области техники. См., например, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics*, Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional (10<sup>th</sup> ed., 2001); *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, ed., Lippincott Williams & Wilkins (20<sup>th</sup> ed., 2003); и *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Ansel et al. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins (7<sup>th</sup> ed., 1999). Способы введения терапевтических композиций субъекту могут быть реализованы на основе процедур, обычно используемых на практике в данной области техники. См., например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Co., 20<sup>th</sup> ed., 2000; Iwasaki et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 88:861-6, 1997; Jespersen et al., *Eur. Heart J.* 11:269-74, 1990; и Martens, *Resuscitation* 27:177, 1994. Обычно композицию, содержащую платформу sCAR-T, вводят (например, путем инъекции) в физиологически приемлемой среде, такой как физиологический раствор, забуференный фосфатом (ФБР (PBS)). Терапевтические композиции можно вводить субъектам, нуждающимся в лечении, любым подходящим путем. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композицию вводят субъекту при помощи парентерального введения. В этих вариантах реализации вводимая композиция должна содержать стерильный водный препарат, который предпочтительно является изотоническим с кровью реципиента.

**[0080]** Переключатель CAR-T и комплементарные sCAR-T-клетки следует вводить субъекту в количестве, достаточном для ингибирования роста и стимулирования регрессии опухоли у субъекта. Достаточное количество клеток можно определить в зависимости от типа опухоли, ее размера и стадии развития, пути введения, возраста конкретного субъекта, которого лечат, и других факторов, которые будут легко очевидны для обычного специалиста в области лечения опухолей. В качестве общего руководства для введения путем инъекции или имплантации субъекту, которого лечат, вводят одну дозу sCAR-T-клеток, содержащую от около  $1 \times 10^5$  до около  $1 \times 10^8$  CAR<sup>+</sup> клеток на кг массы тела. Хотя одну дозу sCAR-T-клеток предпочтительно вводят

субъектам за одно введение, разделение одной дозы на несколько (например, 2, 3 или 4) введений также подходит для практического осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации доза может содержать от около  $5 \times 10^6$  до около  $2 \times 10^7$  клеток на кг массы тела. В различных вариантах реализации доза sCAR-T-клеток может содержать около  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или более клеток на кг массы тела. В качестве альтернативы субъектам с нормальной массой тела (например, около 70 кг или от около 50 кг до около 90 кг) можно вводить дозу sCAR-T-клеток, не требующую перерасчёта исходя из площади поверхности тела. В различных вариантах реализации доза CAR<sup>+</sup> T-клеток, не требующая перерасчёта исходя из площади поверхности тела, может составлять около  $20 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$ ,  $60 \times 10^6$ ,  $80 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $120 \times 10^6$ ,  $140 \times 10^6$ ,  $160 \times 10^6$ ,  $180 \times 10^6$ ,  $200 \times 10^6$ ,  $300 \times 10^6$ ,  $400 \times 10^6$ ,  $500 \times 10^6$ ,  $600 \times 10^6$ ,  $700 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$ ,  $900 \times 10^6$ ,  $1000 \times 10^6$  или более клеток.

**[0081]** В некоторых вариантах реализации субъекту можно вводить дозу CAR<sup>+</sup> T-клеток, не требующую перерасчёта исходя из площади поверхности тела, составляющую от около  $35 \times 10^6$  до около  $700 \times 10^6$  (или около  $1400 \times 10^6$ ) CAR<sup>+</sup> T-клеток. Для пациента с массой тела 70 кг эта доза CAR<sup>+</sup> T-клеток эквивалентна от около  $0,05 \times 10^7$  до около  $1 \times 10^7$  (или  $2 \times 10^7$ ) клеток/кг массы тела. В некоторых из этих вариантов реализации субъекту вводят дозу клеток, не требующую перерасчёта исходя из площади поверхности тела, составляющую от около  $140 \times 10^6$  клеток до около  $700 \times 10^6$  клеток, как здесь проиллюстрировано. Для пациента с массой тела 70 кг эта доза CAR-T-клеток эквивалентна около  $0,2 \times 10^7$  -  $1 \times 10^7$  клеток/кг массы тела. Для лечения субъектов с существенно отличающейся массой тела доза CAR-T-клеток, основанная на массе тела в кг, может быть соответствующим образом скорректирована. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации субъекту вводят плоскую дозу, составляющую около  $140 \times 10^6$  клеток, что эквивалентно  $0,2 \times 10^7$  клеток/кг массы тела для субъектов с массой тела около 70 кг.

**[0082]** Для молекулы-переключателя CAR-T суточная доза может находиться в диапазоне от около 0,0001 мг до около 10 мг на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации вводимая суточная доза переключателя составляет от около 0,00025 мг до около 2,5 мг на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации вводимая суточная

доза переключателя составляет любое количество от около 0,0005 мг (или 0,00075, или 0,001 мг) до около 0,5 мг (или 1 мг, 1,5 мг или 2 мг) на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации вводимая суточная доза переключателя составляет любое количество от около 0,01 мг (или 0,005 мг) до около 0,1 мг или 1 мг на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации вводимая суточная доза переключателя составляет любое количество от около 0,045 мг до около 0,075 мг на кг массы тела. В различных вариантах реализации суточная доза вводимой молекулы-переключателя CAR-T может составлять около 0,0001 мг, 0,00025 мг, 0,0005 мг, 0,00075 мг, 0,001 мг, 0,0025 мг, 0,005 мг, 0,0075 мг, 0,01 мг, 0,025 мг, 0,05 мг, 0,06 мг, 0,075 мг, 0,1 мг, 0,25 мг, 0,5 мг, 0,75 мг, 1 мг, 1,5 мг, 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг или более на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации вводимая суточная доза молекулы-переключателя CAR-T может составлять около 0,01 мг, 0,025 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,045 мг, 0,05 мг, 0,055 мг, 0,06 мг, 0,065 мг, 0,070 мг, 0,075, 0,085 или 0,095 мг. В некоторых предпочтительных вариантах реализации суточная доза вводимой молекулы-переключателя CAR-T составляет около 0,06 мг. Как и при введении CAR-T-клеток, указанные дозы молекулы-переключателя CAR-T также можно вводить за одно введение или путем множества введений.

**[0083]** В некоторых вариантах реализации CAR-T-клетки вводят субъекту, которого лечат, только в начале лечения (например, один или два введения), в то время как молекулу-переключатель CAR-T вводят множество раз на основании «графика включения/выключения» в течение курса лечения, например, в течение первых нескольких недель или месяцев после этого. Как приведено здесь в качестве примера график включения/выключения содержит несколько циклов, причем каждый цикл содержит фазу "включения" и фазу "выключения". Переключатель CAR-T вводят субъекту во время фазы «включения», а во время фазы «выключения» переключатель CAR-T не вводят. В различных вариантах реализации субъекту можно вводить молекулу-переключатель два раза в сутки, ежедневно, через сутки, каждые трое суток или дольше в течение фазы "включения", которая длится определенный период времени (например, любой продолжительностью от около одних суток до нескольких недель). Фаза «выключения» цикла может представлять собой любой период, который длиннее, чем интервал введения во время фазы «выключения». Таким образом,

например, когда введение происходит каждые сутки или через сутки во время фазы «включения», фаза «выключения» может длиться любой период времени от около нескольких суток до около нескольких лет. В различных вариантах реализации фаза «включения» может составлять, например, 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или дольше, при этом введение происходит один раз в сутки, один раз в двое суток, один раз в 3 суток или дольше. Для каждой из этих фаз «включения», фаза «выключения» может составлять, например, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 год или дольше. Продолжительность фазы «включено» и фазы «выключено» может быть, соответственно, одинаковой для множества циклов. В качестве альтернативы, длительность фазы «включения» и/или фазы «выключения» может варьировать в зависимости от различных циклов. В качестве конкретного примера, как подробно описано ниже, обработка может содержать по меньшей мере около 6 циклов. Каждый цикл может длиться 28 суток, причем фаза включения и выключения составляет 7 суток и 21 сутки, соответственно, как приведено здесь в качестве примера.

**[0084]** Количество клеток и частота введения также могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно небольшое количество клеток может быть введено с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые субъекты могут продолжать получать лечение до конца жизни. В терапевтических приложениях может потребоваться относительно большое количество клеток с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование опухоли не будет уменьшено или прекращено, и, предпочтительно, до тех пор, пока субъект не продемонстрирует частичную или полную регрессию опухоли. После этого в отношении субъекта можно применять профилактическую схему введения.

**[0085]** В некоторых вариантах реализации описанные здесь терапевтические композиции можно вводить локально путем имплантации в пораженный участок мембраны, при помощи губки или другого подходящего материала, на котором абсорбирована или инкапсулирована описанная здесь платформа sCAR-T. При

использовании устройства для имплантации это устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка раскрытой здесь платформы CAR-T может осуществляться непосредственно через устройство при помощи болюса, или путем непрерывного введения, или через катетер с использованием непрерывной инфузии.

**[0086]** В качестве конкретных примеров некоторые терапевтические способы в соответствии с данным изобретением включают первое введение (например, путем инфузии) субъекту с CD19-положительной рецидивирующей/рефрактерной В-клеточной злокачественной опухоли, одной дозы, составляющей от около  $0,35 \times 10^8$  до около  $7 \times 10^8$  CAR-T-клеток, которые содержат последовательность CAR, представленную в SEQ ID NO: 6, и последующее введение указанному субъекту в течение одного или более циклов инфузии молекулы-переключателя CAR-T, которая представляет собой Fab-антитело против CD19, содержащее последовательность вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно. Каждый из инфузионных циклов включает (1) фазу «включения», составляющую от около 5 до около 9 суток, и (2) фазу «выключения», составляющую от около 14 до около 28 суток. Во время фазы включения вводят суточную дозу, составляющую от около 0,045 мг до около 0,075 мг переключателя на кг массы тела. В некоторых из этих вариантов реализации используемые CAR-T-клетки являются аутологичными для субъекта. В некоторых вариантах реализации инфузионная доза CAR-T-клеток составляет около  $1,4 \times 10^8$  клеток, а суточная доза переключателя CAR-T, вводимая путем инфузии во время фазы «включения», составляет около 0,06 мг на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации фаза «включения» составляет около 7 суток, а фаза «выключения» составляет около 21 суток. В различных вариантах реализации количество циклов инфузии для введения переключателя CAR-T может составлять 2, 3, 4, 5, 6 или более. В некоторых вариантах реализации в отношении субъекта осуществляют прекондиционирование, направленное на лимфодеплецию, перед инфузией CAR-T-клеток и молекулы-переключателя. В некоторых из этих вариантов реализации прекондиционирование, направленное на лимфодеплецию, осуществляют путем химиотерапии циклофосфамидом и флударабином.

**[0087]** Описанную здесь платформу sCAR-T можно использовать в комбинации с другими известными схемами введения доз для лечения видов рака. Способы совместного введения с дополнительным терапевтическим агентом хорошо известны в данной области. См., например, Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; and Chabner и Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.

### ПРИМЕРЫ

**[0088]** Следующие примеры приведены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, а не для ограничения его объема. Другие варианты изобретения будут легко понятны специалисту в данной области техники и охвачены формулой изобретения.

Пример 1. Исследования, обеспечивающие IND, терапии на основе sCAR-T для пациентов-людей с раком

**[0089]** «Переключаемая» терапия CAR-T (sCAR-T) характеризуется активностью sCAR-T-клеток, контролируемой переключателем на основе антитела. Переключатель нацелен на опухолевый антиген, и sCAR распознает уникальный пептид, привитый на переключатель. Переключатель создает мостик между sCAR-T-клеткой и опухолевой клеткой, активируя sCAR-T-клетки и индуцируя уничтожение опухолевых клеток. Платформа для лечения на основе sCAR-T, используемая авторами изобретения, содержит гуманизованную инертную CAR-T-клетку (также обозначаемую в настоящем документе CLBR001) и соответствующую молекулу-переключатель (акже обозначаемую в настоящем документе SWI019). Внеклеточный домен CAR (SEQ ID NO: 6) CAR-T-клетки содержит гуманизованный scFv-фрагмент антитела (SEQ ID NO: 7), который специфически связывает пептид-производное GCN4 (SEQ ID NO: 1) в молекуле-переключателе. Молекула-переключатель дополнительно содержит Fab-антитело, нацеленное на CD19 (с последовательностью варибельной области тяжелой и легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 3 и 2, соответственно), N-конец легкой цепи которого слит с пептидом GCN4. Более подробная информация об этой

платформе sCAR-T представлена, например, в WO2018/075807. Было продемонстрировано, что, хотя каждая из молекулы-переключателя и sCAR-T-клетки по отдельности разработана таким образом, чтобы быть неактивной, их комбинация дает полное устранение опухолей в ксенотрансплантатах и сингенных моделях. Короткий период полужизни переключателя позволяет быстро модулировать активность sCAR-T-клеток путем введения дозы переключателя. Кроме того, замена различных переключателей позволяет модульным образом перенаправлять sCAR-T-клетки против других опухолевых мишеней. Кроме того, было продемонстрировано, что циклическая стимуляция включения/выключения sCAR-T-клеток обеспечивает улучшение памяти и персистенцию sCAR-T-клеток.

**[0090]** Используя эту приведенную в качестве примера платформу sCAR-T, авторы изобретения провели исследования, результатом которых является IND (досье нового исследуемого препарата), для подготовки и поддержки первого клинического исследования терапии sCAR-T на человеке (ВНЧ, FII). Доклиническая разработка платформы, которая включает sCAR-T-клетку, у которой отсутствует какая-либо эндогенная антигенная мишень, в комбинации с переключающей молекулой на основе антитела, у которой отсутствует собственная активность в отсутствие sCAR-T-клетки, потребовала разработки новых подходов. Надежность такой системы имеет важное значение для контроля, соответственно, для подтверждения того, что клетки CLBR001 не активировались в присутствии нормальных тканей, исследования активности *in vitro* проводили путем совместного культивирования клеток CLBR001 в присутствии или в отсутствие SWI019 и панели из 14 первичных клеток. Эта панель представляла жизненно важные ткани всего организма. Результаты показывают, что CLBR001 не продемонстрировал активности ни в одном из 14 протестированных типов клеток, что подтверждает высокую точность распознавания CLBR001 для SWI019.

**[0091]** Поскольку SWI019 не обладает активностью в отсутствие клеток CLBR001, традиционные токсикологические исследования для определения «уровень, при котором не наблюдались нежелательные эффекты» (NOAEL) в поддержку того, что понятие начальной дозы при первом применении у человека неприменимо. В таких случаях обычно используют дозу, оказывающую минимальное ожидаемое биологическое действие (ДОМОБД (MABEL)), для обоснования исходной дозы для человека на основании прогнозируемой  $C_{max}$ . Тем не менее, активность SWI019 на

фемтомолярном уровне *in vitro* в комбинации с CLBR001 приводила в результате к исходным дозам, которые моделировались как выходящие далеко за пределы диапазона потенциальной клинической активности. Таким образом, был разработан подход к определению ДОМОБД (MABEL) на основе *in vivo*. В данном исследовании клетки CLBR001 вводили мышам NSG, несущим опухоли клеток CD19+ Nalm-6, и осуществляли титрование разовой дозы SWI019. Сравнение величин эффективной дозы SWI019 (средняя эффективная доза ED<sub>50</sub>) для противоопухолевой активности, периферических цитокинов и клеток CLBR001 в периферической крови продемонстрировало то, что снижение опухолевой нагрузки Nalm-6 было наиболее чувствительным маркером активности. Экстравазация клеток CLBR001 из периферической крови и всех трех цитокинов (интерферона гамма (IFN-γ), интерлейкина 2 (IL-2) и фактора некроза опухоли альфа (TNF-α)) демонстрировала более слабые величины ED<sub>50</sub>. Таким образом, противоопухолевая активность (снижение опухолевой нагрузки Nalm-6) была выбрана в качестве параметра для определения ДОМОБД (MABEL) *in vivo*. Аллометрическое масштабирование с использованием данных PK мыши и NHP SWI019 применяли для моделирования рекомендуемой дозы SWI019 у людей, соответствующей ED<sub>20</sub> исследования ДОМОБД (MABEL) *in vivo*. Было обнаружено, что по сравнению с дозой, смоделированной с использованием подхода MABEL *in vitro*, подход ДОМОБД (MABEL) *in vivo* обеспечил первую отправную точку для человека, которая была около в 13000 раз выше. Результаты данного исследования обеспечивают отличную отправную точку для первого исследования на людях, которое уравнивает безопасность и потенциальную пользу для пациента.

**[0092]** На фиг. 1 и 2 представлена более подробная информация, связанная с исследованиями:

**[0093]** Фиг. 1 относится к подходу на основе ДОМОБД (MABEL) *in vivo* для оценки дозы ВНЧ (FII). Моделирования ДОМОБД (MABEL) *in vitro* представляли проблемы для доставки таких низких количеств и потенциально требовало бы много когорт пациентов, получающих дозу, до достижения терапевтической дозы. Таким образом, с помощью ксенотрансплантата Nalm-6 был разработан подход ДОМОБД (MABEL) *in vivo*. В этих исследованиях изучали снижение опухолевой нагрузки, цитокинов и sCAR-T в периферической крови.



**[0094]** На фиг. 2 обобщены смоделированные эквивалентные дозы для человека переключателя SWI019. Они основаны на наиболее чувствительных маркерах, отслеживаемых в фармакологическом анализе *in vitro* и *in vivo* при лечении комбинацией CAR-T-клетки CLBR001 и переключателя SWI019.

**[0095]** В заключение, подход ДОМОБД (MABEL) *in vivo* позволил определить исходную дозу переключателя в первом клиническом исследовании на человеке (ВНЧ (ФН)) (9,7 мкг/кг), которая около в 13 раз выше по сравнению с моделированием ДОМОБД (MABEL) *in vitro*. Этот подход обеспечивает отличную отправную точку для первого клинического исследования на человеке, которое уравнивает безопасность и потенциальную пользу для пациента.

**Пример 2.** Изучение переключаемой платформы CAR-T-клеток на людях для лечения опухолей

**[0096]** На основе результатов исследований на животных, обеспечивающих IND, описанных выше, было инициировано клиническое исследование на людях (NCT04450069) терапии с включением/выключением sCAR-T (CLBR001 + SWI019) для лечения рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований. Нацеленные против CD19 Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR) представляют собой трансформационный вариант лечения пациентов с рецидивирующими, рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями. Несмотря на замечательные ответы у пациентов, получавших интенсивное предварительное лечение, остаются проблемы, связанные с токсичностью, включая синдром высвобождения цитокинов (СВЦ (CRS)) и синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (СНАИЭК (ICANS)), наряду с рецидивом, связанным с утратой опухолевого антигена. Описанное здесь лечение sCAR-T предназначено для решения этих проблем.

**[0097]** Открытое исследование фазы 1 с увеличением дозы было предназначено для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики, фармакодинамики и клинической активности комбинации CLBR001 и SWI019 у пациентов-людей с рецидивирующими/рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями. В частности, аутологичные sCAR-T-клетки CLBR001 были приготовлены из материала афереза, отобранного у пациентов, в централизованном

производственном предприятии. После лимфодеплеции циклофосфамидом и флударабином пациенты получали разовую дозу клеток CLBR001 с последующей суточной инфузией SWI019 в течение 7 суток. Доза CAR-T-клеток составляет от около  $140 \times 10^6$  клеток до около  $700 \times 10^6$  клеток. Для пациента с массой тела 70 кг эта разовая доза CAR-T-клеток эквивалентна около  $0,2 \times 10^7$ - $1 \times 10^7$  клеток/кг массы тела.

Молекулу-переключатель SWI019 вводили с 28-суточным циклом до 6 циклов.

Каждый цикл состоит из ежедневного внутривенного (ВВ) введения в течение 7 суток, а затем 21 суток без введения дозы. Повышение дозы CLBR001 и SWI019 определяли в исходных когортах с помощью [3+3] дизайна с последующей реализацией правил принятия решений по байесовскому адаптивному дизайну (BAYDE).

**[0098]** Три пациента (2 фолликулярных лимфомы и 1 мантийноклеточная лимфома) в когорте 1 ( $140 \times 10^6$  CAR-T-клеток + 10 мкг/кг SWI019) имеют поддающиеся оценке данные о безопасности и ответе на момент завершения сбора данных. CLBR001 + SWI019 хорошо переносились в когорте 1 без обнаружения DLT (ДЛТ). Инфузия клеток CLBR001 хорошо переносилась без каких-либо неблагоприятных явлений, связанных с клеточным продуктом, у любых пациентов в течение периода наблюдения до введения дозы SWI019, что указывает на отсутствие активности клеток CLBR001 в отсутствие SWI019. Повышенные уровни цитокинов в сыворотке крови и увеличение уровня CLBR001 в периферической крови обнаруживали только после введения SWI019. Доза SWI019 хорошо переносилась с 1 случаем сопутствующего CRS 1-й степени и ICANS 2-й степени, которые обнаружены в цикле 2. Это явление исчезало в течение 24 часов после введения дексаметазона без рецидива CRS, обнаруживаемого при продолжении введения уменьшенной дозы (50%) SWI019, что обеспечивает поддержку переключаемости платформы. В первой когорте у 2 из 3 пациентов наблюдался полный ответ в соответствии с критериями Лугано.

**[0099]** Это первый отчет о переключаемой платформе CAR-T-клеток у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями. Было обнаружено, что комбинация CLBR001 + SWI019 является безопасной и хорошо переносимой у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями с обнадеживающей клинической активностью в когорте 1 с использованием самых низких доз как CLBR001, так и SWI019.

**[00100]** Некоторая подробная информация о дизайне и результатах терапии человека представлена на фиг. 3 и 4:

**[00101]** На фиг. 3 представлен эффект лечения у одного пациента, как показано с помощью компьютерной томографии (КТ (СТ)) до лечения, цикла 3 после лечения и цикла 6 после лечения. Демографические данные для пациентов, анамнез заболевания и ответ на лечение обобщены вверху. На 3 изображениях КТ (СТ) в нижней части представлено целевое поражение брыжеечных лимфатических узлов для 3 моментов времени, соответственно. Эти результаты указывают на то, что на исходном уровне («предварительное лечение») было 5 целевых поражений в брыжеечных, паховых, подвздошных и парааортальных лимфатических узлах. Измеренная масса брыжеечных лимфатических узлов составляла 14,1 см. Общий балльная оценка Deauville 5PS в соответствии с позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ (PET)) составляла 4. После лечения наблюдается уменьшение всех 5 FDG-avidных целевых поражений. Не обнаружили никаких новых целевых масс, а также не было никаких свидетельств присутствия лимфомы в костном мозге на основании иммуногистохимии (ИГХ, ИНС). Через 11 месяцев после начала лечения у пациента наблюдалась постоянная полная ремиссия (ПР (CR)) по Лугано и RECIP.

**[00102]** На фиг. 4 показано быстрое разрешение токсичности у другого пациента, которого лечили. Демографические данные пациентов, анамнез заболевания и ответ на лечение обобщены в панели А. Панель В демонстрирует, что прекращение введения дозы переключателя на 7 сутки цикла 1 (C1D7) приводило к быстрому разрешению лихорадки, несмотря на продолжающееся расширение CAR-T, демонстрируя функциональные возможности «выключения». На панели С показано, что синдром высвобождения цитокинов 1 степени (СВЦ 1 ст. (Gr 1 CRS))/нейротоксичности, ассоциирующиеся с иммунными эффекторными клетками 1 степени (НАИЭК 1 ст. (Gr 1 ICAN)), в дозе SWI019 на 1 сутки цикла 2 быстро устранялся с помощью dex, и что продолжение введения 50% дозы (5 мкг/кг) не вызывало дополнительной токсичности.

**[00103]** Результаты клинического исследования с участием людей указывают на то, что комбинация молекулы-переключателя CLBR001 sCAR-T cell + SWI019 является безопасной и хорошо переносимой. Эта комбинация демонстрирует обнадеживающие признаки клинической активности у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями. Таким образом, до введения SWI019 не было зарегистрировано

никаких нежелательных явлений, связанных с CLBR001, что демонстрирует безопасность самих клеток CLBR001 и достоверность взаимодействия CBLR001 + SWI019 (т. е. CLBR001 не реагирует с эндогенными человеческими мишенями). Два ПР были достигнуты с максимальной степенью CRS/ICANS = 1 при самых низких дозах CLBR001 и SWI019 (когорты 1;  $140 \times 10^6$  CAR-T-клеток, 10 мкг/кг SWI019). Реактивация CLBR001 под действием SWI019 в цикле  $\geq 2$  демонстрирует функциональную обратимость платформы. Быстрое разрешение токсичности достигалось путем сохранения или уменьшения уровня дозы SWI019, демонстрируя потенциал для большей безопасности платформы CLBR001 + SWI019

Пример 3. Клинические исследования для определения рекомендуемой дозы для фазы II (RP2D)

**[00104]** Клиническое исследование фазы I с увеличением дозы у человека проводили для изучения оптимальной схемы введения доз лечения субъектов с В-клеточными злокачественными новообразованиями (CBR-sCAR19-3001, NCT04450069), при помощи переключаемой CAR-T CLBR001 + SWI019, как продемонстрировано на фиг. 5. На фиг. 5А представлен обзор дизайна исследований фазы I на людях. Критерии отбора субъектов включали рецидивирующие/рефрактерные В-клеточные злокачественные новообразования, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДВККЛ (DLBCL)), фолликулярную лимфому (ФЛ (FL)), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ (CLL)), мантийноклеточную лимфому (МКЛ (MCL)), лимфому маргинальной зоны (ЛМЗ (MZL)) и другие результаты гистологического исследования. Субъекты, с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ (ALL)), ранее проходившие терапию CAR-T-клетками, и субъекты с предшествующей аллогенной трансплантацией стволовых клеток исключались. Первые две когорты исследования исследовали в испытании с увеличением дозы переключателя (SWI019), начиная с 10 мкг/кг и продолжая до 30 мкг/кг в дизайне увеличения дозы 3+3. Субъекты в первых двух когортах получали  $140 \times 10^6$  CAR+ клеток до получения SWI019. Следующие когорты использовали байесовский адаптивный дизайн увеличения дозы (BAYDE) для определения оптимальной дозы. В когорте 4 оценивали 60 мкг/кг SWI019 с  $140 \times 10^6$  CAR+ клетками, а в когорте 5 оценивали 30 мкг/кг SWI019 с  $420 \times 10^6$  CAR+ клетками. В когорте 5 можно было необязательно

тестировать дозы, определенные с помощью модели BAYDE. Целью дизайна было установление рекомендуемой дозы CAR+ Cell и SWI019 для фазы II для использования в будущих исследованиях. Установленная доза клеток CLBR001 может быть использована с SWI019 или в комбинации с другими переключателями в будущих исследованиях.

**[00105]** Как показано в обзоре схемы лечения, представленном на фиг. 5B, субъекты, включенные в исследование CBR-sCAR19-3001, получали следующее лечение. Пациентов сначала просили дать согласие, а затем проверяли на соответствие критериям отбора. У субъектов, которые соответствовали предварительно определенным критериям включения и исключения, продукт лейкофереза отправляли на централизованное производственное предприятие, где Т-клетки выделяли и трансдуцировали вектором sCAR. Изготавливали и выпускали клеточный продукт, который затем отправляли обратно в центр лечения субъекта. Субъект получал химиотерапевтическую лимфодеплецию (обычно циклофосфамид и флударабин) с последующей инфузией клеток CLBR001. Затем субъекты получали цикл SWI019 следующим образом: 7 суточных доз SWI019 с последующим 21 сутками отсутствием введения доз в 28-суточном цикле. Субъектов оценивали среди других оценок на предмет дозопонижающей токсичности, ответов (с помощью ПЭТ/КТ каждые 28 суток в зависимости от обстоятельств) и фармакодинамических биомаркеров (цитокинов в периферической крови).

Таблица 1. Сводная информация об исходах у первых 9 субъектов с доступными данными:

	sCAR19-3001	ZUMA-1	JULIET	TRANSCEND
	CLBR001 + SWI019	Yescarta	Kymriah	Breyanzi
	Calibr <sup>1</sup>	Kite <sup>2</sup>	Novartis <sup>2</sup>	BMS <sup>2</sup>
ЧОО (ORR)	7/9 (78%)	74%	52%	73%
ПР (CR)	6/9 (67%)	54%	40%	53%
СВЦ (CRS) (степень $\geq$ 3)	2/9 (22%)	10%	22%	2%
Медианное время до устранения СВЦ (CRS) (любой степени)	1 сутки	8 суток	7 суток	5 суток
ICANS (степень $\geq$ 3)	0%	32%	11%	10%
Медианное время до	3 суток	17 суток	14 суток	11 суток

разрешения СНАИЭК (ICANS) (любой степени)				
Синдром лизиса опухоли (СЛО (TLS)) (степень $\geq 3$ )	0%	1%	1%	1%
Смертельные случаи, связанные с лечением	0%	2%	--	1%
Инфекции (степень $\geq 3$ )	3/9 (33%)	28%	20%	12%
% Субъектов, получающих мост-терапию	5/9 (56%)	0% (н.д.)	90%	59%
Применение тоцилизумаба	3/9 (33%)	43%	14%	20%

Источник ZUMA-1, JULIET AND TRANSCEND: Westin et al., Hematol. 96: 1295-1312, 2021

**[00106]** У первых 9 субъектов, для которых имелись данные на момент завершения сбора данных, у 7 наблюдался частичный ответ (ЧО (PR)) или полный ответ (ПО (CR)) (78%), а у 6 наблюдался ПО (CR) (67%). У двух из 9 субъектов имелся синдром высвобождения цитокинов 3 степени или выше (СВЦ (CRS)), и ни у одного из субъектов не было нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками 3 степени или выше (ICANS (СНАИЭК)). Среди первых 9 субъектов медианное время до устранения любой степени СВЦ (CRS) составило 1 сутки, а медианное время до устранения любой степени СНАИЭК (ICANS) составило 3 суток. Последнее благоприятно отличается от медианного времени до устранения СВЦ (CRS) или СНАИЭК (ICANS) для трех одобренных Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) продуктов CAR-T-клеток. Ожидается, что сокращение продолжительности СВЦ (CRS) будет обусловлено способностью удерживать или уменьшать дозировку SWI019, что не возможно для обычных продуктов CAR-T-клеток.

**[00107]** Исходы у первых 14 субъектов в первых 4 когортах, получавших лечение в исследовании CBR-sCAR19-3001, продемонстрированы в таблице 2. В первых 3 когортах не наблюдалось дозолимитирующего токсического действия в когорте 4 - 2 ДЛТ (DLT). ДЛТ (DLT) определяли как связанные с лечением неблагоприятные явления, возникающие в течение периода ДЛТ (DLT), которые обнаруживали на 35 сутки после первой дозы SWI019 для когорт 1 и 2 и на 28 сутки после первой дозы SWI019 для когорт 3 и 4. Ответ ДЛТ (DLT) с поздним началом определяли как неблагоприятные явления, связанные с лечением, соответствующие критериям ДЛТ (DLT), которые возникали после окон ДЛТ (DLT). Эффективный ответ определяли как

субъектов с ЧО (PR) или ПО (CR). На момент завершения сбора данных два субъекта находились на рассмотрении, а для одного субъекта информация отсутствовала. Фармакодинамический ответ (ФДО (PD)) определяли как уровни цитокинов периферической крови, которые увеличивались в 3 раза по сравнению с базовым уровнем после введения дозы SWI019.

Таблица 2. Список первых 14 субъектов

Когорты по дозам (SWI019/CLBR001)	Субъект	ДЛТ (DLT) Ответ на лечение	Позднее начало Ответ ДЛТ (DLT)	Эффективност ь Ответ на лечение	ФДО (PD) Ответ на лечение
Когорта 1 (10 мкг/кг / 140e6)	102-001-10101	Нет	Нет	Нет	Да
	104-102-10102	Нет	Нет	Да	Да
	103-104-10104	Нет	Нет	Да	Да
Когорта 2 (30 мкг/кг / 140e6)	106-105-10201	Нет	Нет	Нет	Да
	109-108-10202	Нет	Да	Да	Да
	107-111-10203	Нет	Нет	Да	Да
	104-113-10301	Нет	Нет	Да	Да
Когорта 3 (60 мкг/кг / 140e6)	108-116-10402	Нет	Нет	Да	Да
	107-120-10302	Нет	Нет	Нет На рассмотрении	Да
	105-123-10407	Нет	Нет	(Имеется)	Да
Когорта 4 (30 мкг/кг / 420e6)	105-118-10403	Нет	Нет	Да	Да
	107-119-10404	Нет	Нет	Неизвестно (отсутствии) На рассмотрении	Да
	107-121-10405	Да	Нет	(Имеется)	Да
	104-122-10406	Да	Нет	Да	Да

**[00108]** Для определения оптимальной дозы переключателя и CLBR001 (ОДП (OSD)) применяли модель BAYDE с использованием данных из таблицы выше (фиг. 6). BAYDE представляет собой дизайн для определения дозы с использованием кривых зависимости доза-токсичность/ответ, основанных на ретроспективных и кумулятивных данных исследования, чтобы рекомендовать безопасные, активные и эффективные схемы введения доз с помощью байесовского адаптивного моделирования и модель байесовской логистической регрессии (МБЛР (BRLM)). Рекомендуемые дозы оптимально подбираются в различных диапазонах доз. Подход BAYDE поддерживает лучшее принятие решений с использованием зависимостей исходных доз, основанных на ретроспективных данных о безопасности, токсичности,

ФДО (PD) и эффективности, хорошо зарекомендовавших себя байесовских подходах к моделированию и зависимостях доз, обновленных в ходе исследования. Цели выбора дозы заключаются в том, чтобы: (а) предоставить рекомендации по оптимальному введению доз с использованием имеющихся данных, (б) определить максимальную переносимую дозу (МПД (MTD)) или (в) определить уровни ОДП (OSD,) которые ниже МПД (MTD) и имеют приемлемый ответ ФДО (PD) и/или эффективности. Уровни доз (а) являются безопасными, когда существует менее 25% риска (порог приемлемости безопасности) того, что частота ДЛТ (DLT) превышает 33%, и (б) имеют приемлемый ответ ФДО (PD) и/или эффективности, когда оцениваемая частота ответа составляет по меньшей мере 50%. Для модели BAYDE в этом исследовании для выбора дозы авторы изобретения использовали четыре конечные точки: 1: двоичная переменная для стандартной ДЛТ (DLT), 2: двоичная переменная для ДЛТ (DLT) с поздним началом, 3: двоичная переменная для ответа эффективности, 4: двоичная переменная для ответа ФДО (PD). Допустимые диапазоны доз составляли SWI019 10-1000 мкг/кг и CLBR001 140-700е6 CAR+ клеток.

**[00109]** Для расчета индекса клинической полезности для ранжирования комбинаций доз CLBR001 и SWI019 в модель вводили кумулятивные данные субъекта, обновляли модели ответа и оценивали апостериорные вероятности с использованием байесовских методов и симуляций. Индекс клинической полезности, представленный на фиг. 6, является оптимальным при 100, что указывает на подходящий баланс эффективности и потенциала токсичности. Вышеуказанный индекс клинической полезности предполагал, что находящиеся на рассмотрении субъекты были «имеется» в отношении эффективности, а неизвестный субъект был «отсутствует» в отношении эффективности. Таким образом, оптимальная доза переключателя и CLBR001, выбранная для повторений, составляла 60 мкг/кг SWI019 и 140е6 CAR+ клеток.

\*\*\*

**[00110]** Хотя вышеприведенное изобретение было описано довольно подробно в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, специалисту в данной области техники будет легко понять в свете идей настоящего изобретения, что в него могут быть внесены некоторые изменения и модификации без отклонения от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

**[00111]** Все публикации, базы данных, последовательности GenBank, патенты и



заявки на патенты, цитируемые в настоящем описании изобретения, включены здесь путем ссылки, как если бы каждая из них была конкретно и по отдельности включена путем ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, прекращения роста и/или стимулирования регрессии CD19-положительного злокачественного новообразования у субъекта-человека, включающий введение указанному субъекту (а) молекулы-переключателя Т-клеток с химерным антигенным рецептором (переключателя CAR-T), содержащей Fab-антитело против CD19, которое содержит последовательности вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, представленные, в SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно, и (б) комплементарной CAR-T-клетки, содержащей последовательность CAR (химерного антигенного рецептора), представленную в SEQ ID NO: 6; с обеспечением за счет этого лечения, прекращения роста и/или стимулирования регрессии В-клеточного злокачественного новообразования у субъекта.
2. Способ по п. 1, где Fab-антитело против CD19 содержит последовательность легкой цепи и последовательность тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.
3. Способ по п. 1, где субъекту вводят одну дозу CAR-T-клетки в начале лечения и множественные дозы переключателя CAR-T в течение курса лечения.
4. Способ по п. 3, где субъекту вводят одну дозу CAR-T-клеток с последующим одним или множеством циклов инфузии переключателя CAR-T; причем каждый цикл включает фазу «включения» ежесуточной инфузии переключателя CAR-T в течение от около 5 до около 9 суток и фазу «выключения» без введения CAR-T в течение от около 14 до около 28 суток.
5. Способ по п. 3, где доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет около  $60 \times 10^6$ ,  $80 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $120 \times 10^6$ ,  $140 \times 10^6$ ,  $160 \times 10^6$ ,  $180 \times 10^6$ ,  $200 \times 10^6$ ,  $300 \times 10^6$ ,  $400 \times 10^6$ ,  $500 \times 10^6$ ,  $600 \times 10^6$ ,  $700 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$ ,  $900 \times 10^6$ ,  $1000 \times 10^6$  или более клеток.
6. Способ по п. 3, где доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет от около  $0,35 \times 10^8$  до около  $14 \times 10^8$  клеток.

7. Способ по п. 3, где доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет от около  $1,4 \times 10^8$  до около  $7 \times 10^8$  клеток.
8. Способ по п. 3, где доза CAR-T-клеток, вводимая субъекту, составляет около  $1,4 \times 10^8$  клеток.
9. Способ по п. 3, где доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет от около 0,01 мг до около 0,1 мг на кг массы тела.
10. Способ по п. 9, при котором доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет около 0,01 мг, 0,025 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,045 мг, 0,05 мг, 0,055 мг, 0,06 мг, 0,065 мг, 0,070 мг, 0,075 мг, 0,085 мг или 0,095 мг на кг массы тела.
11. Способ по п. 9, где доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет от около 0,045 мг до около 0,075 мг на кг массы тела.
12. Способ по п. 9, где доза переключателя CAR-T, вводимая субъекту, составляет около 0,06 мг на кг массы тела.
13. Способ по п. 1, где указанное CD19-положительное злокачественное новообразование представляет собой CD19-положительный В-клеточный рак.
14. Способ по п. 1, где CD19-положительное злокачественное новообразование представляет собой рецидивирующее/рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование.
15. Способ лечения, прекращения роста и/или стимулирования регрессии CD19-положительного рецидивирующего/рефрактерного В-клеточного злокачественного новообразования у субъекта-человека, включающий (а) введение указанному субъекту одной дозы от около  $0,35 \times 10^8$  до около  $7 \times 10^8$  CAR-T-клеток, причем CAR-T-клетки содержат последовательность CAR, представленную в SEQ ID NO: 6, и затем (б) введение субъекту молекулы-переключателя CAR-T в течение одного или более циклов, каждый из которых включает (1) фазу «включения» от около 5 до около 9 суток и (2) фазу «выключения» от около 14 до около 28 суток, причем в течение фазы «включения» вводят суточную дозу от около 0,045 мг до около 0,075 мг

на кг массы тела, и при этом молекула-переключатель CAR-T содержит Fab-антитело против CD19, которое содержит последовательность легкой цепи и последовательность тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно; с обеспечением за счет этого лечения, прекращения роста и/или стимулирования регрессии CD19-положительного рецидивирующего/рефрактерного В-клеточного злокачественного новообразования у субъекта.

**16.** Способ по п. 15, где CAR-T-клетки являются аутологичными для субъекта.

**17.** Способ по п. 15, где инфузионная доза CAR-T-клеток составляет около  $1,4 \times 10^8$  клеток, и суточная доза переключателя CAR-T, вводимого путем инфузии во время фазы «включения», составляет около 0,06 мг на кг массы тела.

**18.** Способ по п. 15, где фаза «включения» составляет около 7 суток, а фаза «выключения» составляет около 21 сутки.

**19.** Способ по п. 15, где количество циклов инфузии переключателя CAR-T составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более.

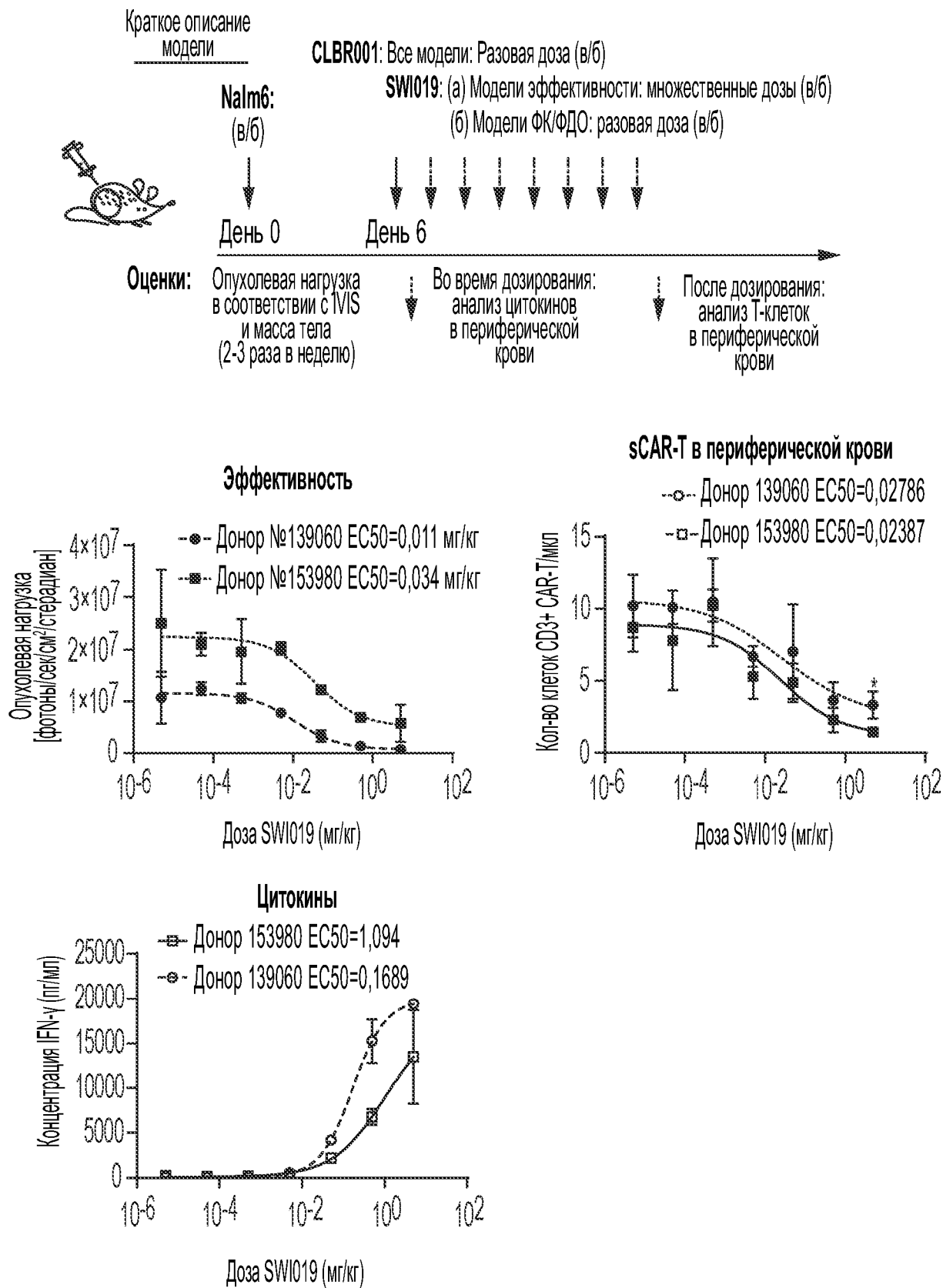
**20.** Способ по п. 15, где субъект получает прекондиционирование, направленное на лимфодеплецию, перед введением CAR-T-клеток и молекулы-переключателя.

**21.** Способ по п. 20, где прекондиционирование, направленное на лимфодеплецию, представляет собой химиотерапию циклофосфамидом и флударабином.

**22.** Способ по п. 15, где CD19-положительное рецидивирующее/рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВКЛ, DLBCL), фолликулярной лимфомы (ФЛ, FL), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ, CLL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МКЛЛ, SLL), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ, MCL), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ, MZ)),

волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ, НСЛ), первичной внутриглазной лимфомы, лимфомы Беркитта и макроглобулинемии Вальденстрема.

Фиг. 1



Фиг. 2

Приближение к дозе, впервые используемой в отношении человека (ДВЧ/ F1H)	Доза, оказывающая минимальное ожидаемое биологическое действие, MABEL (in vitro EC <sub>20</sub> )	MABEL (in vivo EC <sub>20</sub> )	Максимальная неопасная токсическая доза, HNSTD <sup>A,B,C</sup>	Уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов, NOAEL <sup>B,C</sup>
Доза	0,000741 пг/кг	9,7 мкг/кг	81 мкг/кг	806 мкг/кг <sup>D</sup>
Диапазон безопасности до NOAEL	1087719x	83x	10x	1x
Примечания	Основана на in vitro MABEL (EC <sub>20</sub> ) в доклинической модели (0,31 пМ)D	Основана на in vivo MABEL (EC <sub>20</sub> ) в доклинической модели (3,68 мкг/кг)	Основана на 14-дневном соответствующем GLP токсикологическом исследовании с многократным в/б дозированием SW1019 на крысах	Основана на 14-дневном соответствующем GLP токсикологическом исследовании с многократным в/б дозированием SW1019 на крысах

A. Основана на 1/10 потенциальной HNSTD у крыс при дозировании 5 мг/кг с масштабированием до эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ) с применением коэффициента 6,2;

B. Основана на Руководстве ICH S9 «Доклиническая оценка противоопухолевых лекарственных препаратов» (S9 Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceutical) и Отраслевом руководстве по оценке максимальной безопасной начальной дозы в начальных клинических испытаниях терапевтических агентов на взрослых здоровых добровольцах (“Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers”)

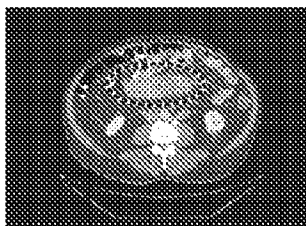
C. Основана на NOAEL у крыс при дозировании 5 мг/кг с масштабированием до ЭДЧ с применением коэффициента 6,2

D. Предсказанная доза MABEL для человека, при которой C<sub>max</sub> достигает EC<sub>20</sub> для активности in vitro

Фиг. 3

Демографические данные	История болезни	Лечение и ответ
Набор №104-102-10102	Диагноз поставлен: в 2012 г.	Доза: 140е6 клеток CAR+/ 10 мкг/кг SW1019
Мужчина, 71 год	Линий предшествующей терапии: 6	Максимальная степень CRS/ICANS: 0
Фолликулярная лимфома	Переходная терапия: (нет)	Наилучший ответ по Лугано: ПО

До лечения



После 3 цикла:



После 6 цикла:



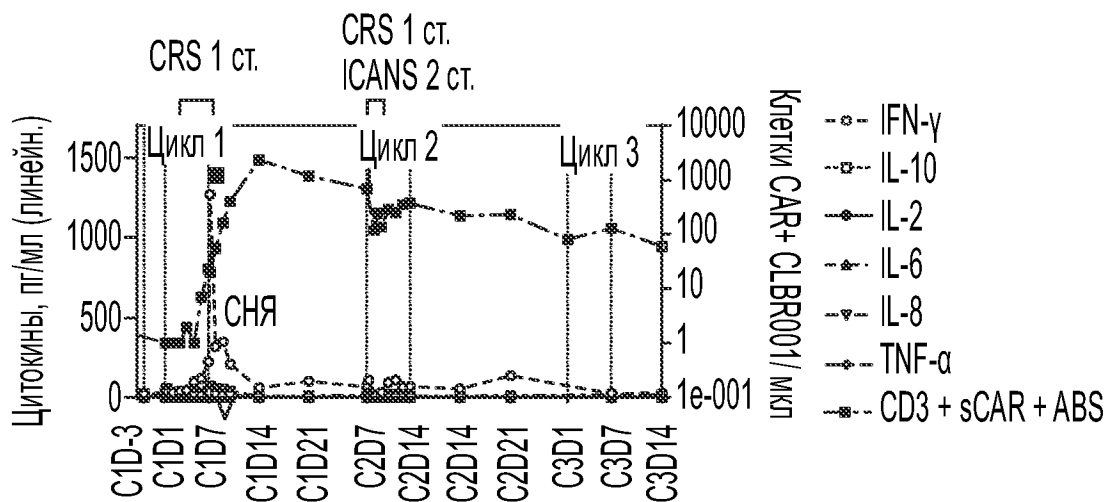


Фиг. 4

А.

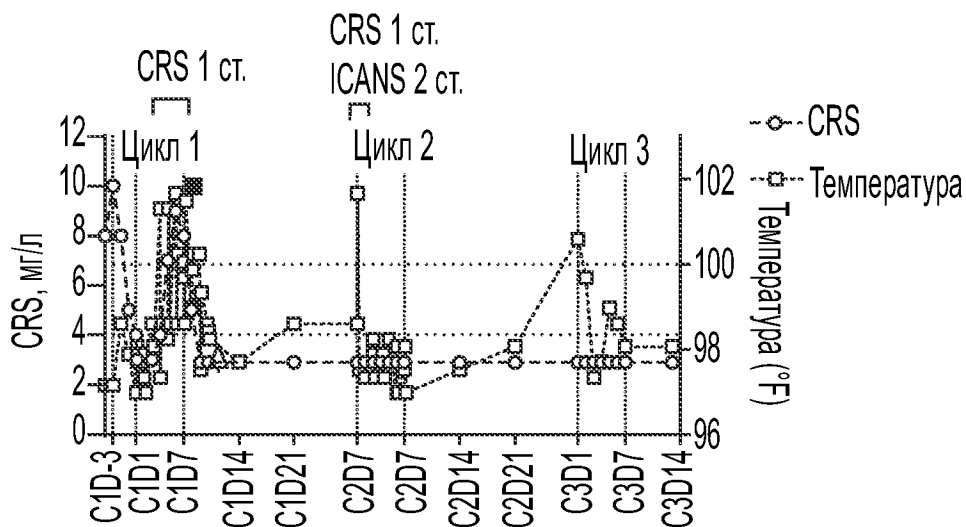
Демографические данные	История болезни	Лечение и ответ
Набор №104-102-10104	Диагноз поставлен: в 2016 г.	Доза: 140е6 клеток CAR+/10 мкг/кг SWI019
Женщина, 70 лет	Линий предшествующей терапии: 7	Максимальная степень CRS/ICANS: 1
Фолликулярная лимфома	Переходная терапия: Дексаметазон	Наилучший ответ по Лугано: ПО

В. 104-102-10104, цитокины и клетки CAR+ / мкл



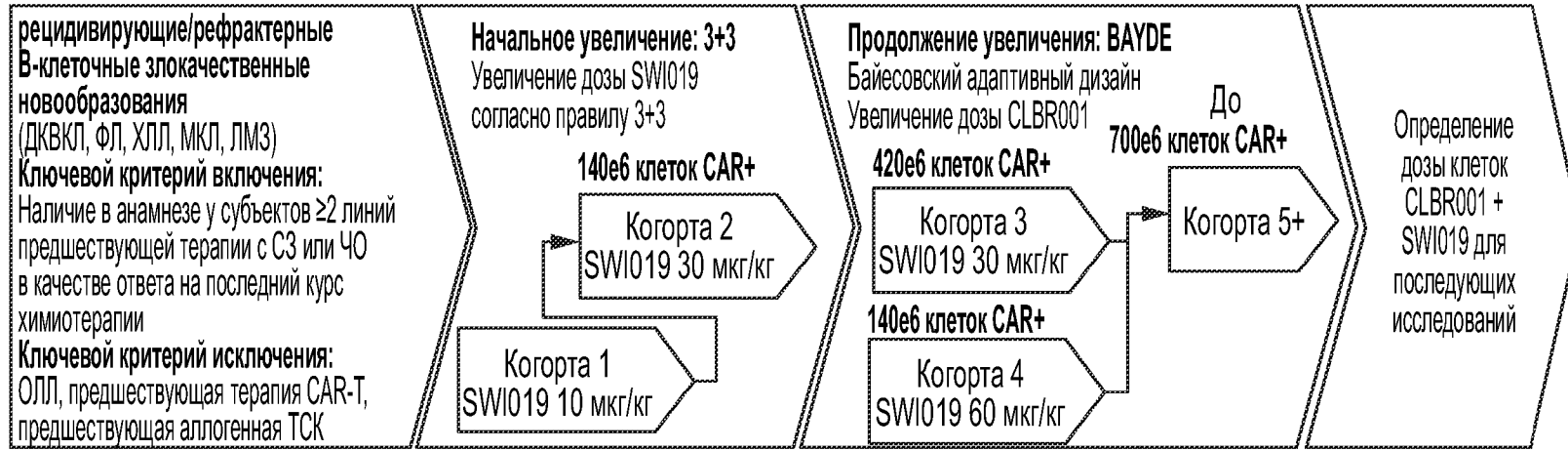
С.

104-102-10104, CRS и температура

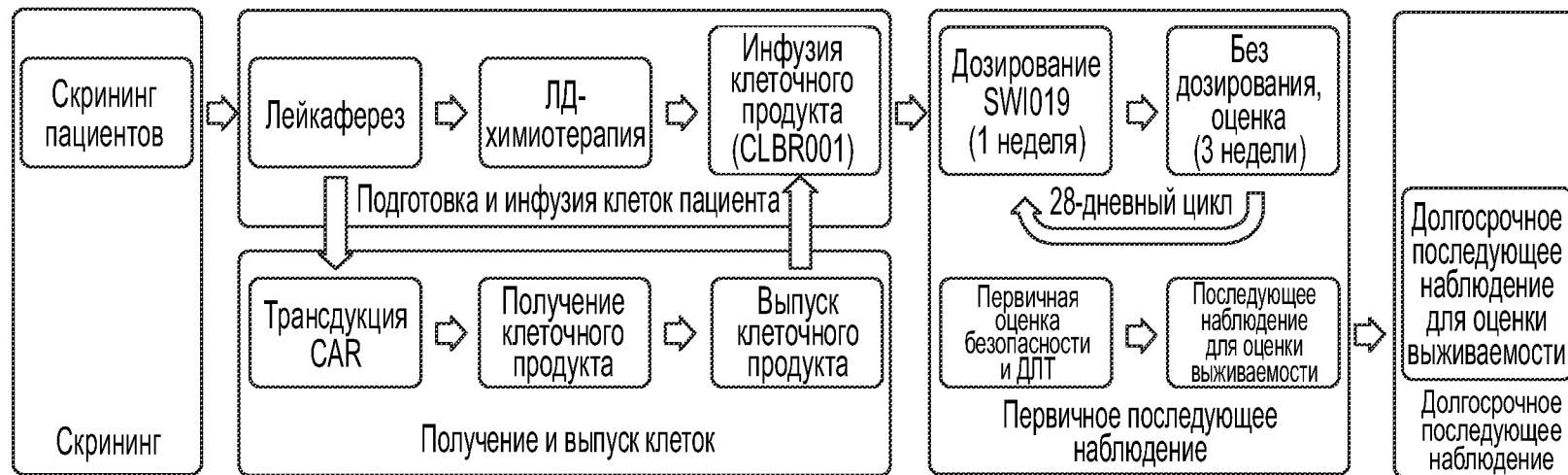


Фиг. 5

А.



В.



Фиг. 6

Рекомендованные дозы						
CLBR001	SWI019					
	10	30	60	100	300	1000
100	78,5	92,7	93,2	91,6	83,8	66,1
420	82,6	97,4	98,0	96,5	89,3	73,7
140	84,1	99,1	100,0	99,1	93,2	79,8