

# Анти-CD19-моноклональные антитела при острой лимфобластной лейкемии у детей

А.И. Каракунский<sup>1</sup>, Ю.В. Румянцева<sup>1</sup>, А. фон Штакельберг<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>2</sup>Университетская клиника педиатрии, специализирующаяся в онкологии и гематологии, Университетского медицинского комплекса Шарите, Берлин, Германия

Контактные данные: Александр Исаакович Каракунский aikarat@mail.ru

Разработка моноклональных антител для лечения гемобластозов является быстро развивающейся областью науки. Ряд соединений оказался эффективен при лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. В то время как неконъюгированные гуманизированные антитела хорошо переносимы и могут быть легко объединены с химиотерапией, иммуноконъюгаты, доставляющие токсические соединения прямо в клетки-мишени, имеют более серьезные побочные эффекты. Антигены с высокой и селективной экспрессией являются идеальными мишениями для использования антител и подходят для исследований фазы I/II и III при ОЛЛ у детей. Антигены, стабильно экспрессирующиеся на поверхности клетки, подходят как для неконъюгированных антител, вызывающих антитело-зависимую клеточную и комплемент-зависимую цитотоксичность, так и для биспецифических антител с участием Т-клеток. Моноклональные антитела обладают совершенно иным механизмом действия по сравнению с таковым обычной химиотерапии и, безусловно, способны существенно изменить стратегию лечения ОЛЛ в будущем.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, иммунотерапия, анти-CD19, блинатумомаб, биспецифические моноклональные антитела

DOI: 10.21682/2311-1267-2016-3-4-60-72

## Anti-CD19 monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia in children

A.I. Karachunskiy<sup>1</sup>, Yu.V. Rumyantseva<sup>1</sup>, A. von Shtakelberg<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia; <sup>2</sup>Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin; 1 Augustenburger Platz, Berlin, 13353, Germany

Creation of monoclonal antibodies for leukaemia treatment is rapidly developing area of science. A number of compounds were effective for treatment of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) at children. While unconjugated humanized antibodies have good tolerability and can be combined with chemotherapy, immunoconjugates, delivering the toxic compounds directly to the target cells, have more serious adverse effects. Antigens with high and selective expression are the ideal targets for usage with antibodies and suitable for studies of phases I/II and III in case of pediatric ALL. Antigens with stable expression on the cells surfaces, suitable both for unconjugated antibodies, leading to antibodies-dependent cell and complement-dependent cytotoxicity, and for bispecific antibodies with participation of T-cells. Monoclonal antibodies have quite different mechanism of action in comparison with routine chemotherapy and, of course, can change the strategy of ALL treatment in future.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, immunotherapy, anti-CD19, blinatumomab, bispecific monoclonal antibody

## Введение

Технология получения гибридом — клеток, продуцирующих моноклональные антитела, впервые была описана в 1975 г. Келером и Мильштейном [1]. Это открытие определило бурный прогресс в использовании антител как для исследовательских, так и для практических целей, и в настоящее время «гибридомная технология» является одним из основных направлений в биотехнологии.

Гибридомы являются бессмертными клеточными клонами, производящими антитела одной специфичности. Гибридомы получают при слиянии нормальных лимфоцитов, продуцирующих антитела, с подходящей

опухолевой линией В-клеток. Затем гибридомы отбирают в культуральной среде, неспособной поддерживать рост родительских клеток. Путем последовательных разведений и пересевов получают одиночные клони, которые можно выращивать в роллерных культурах или в форме асцита в брюшной полости мышей. В последнем случае удается получать особенно высокие титры моноклональных антител. При этом, естественно, все молекулы иммуноглобулинов, продуцируемые определенной гибридомой, идентичны: они относятся к одному классу и одному аллотипу, имеют одинаковые вариабельные области, структуру, идиотип, аффинность и специфичность к данному эпитопу.

Вначале, так как лимфоциты были мышиные и синтезировали мышиный иммуноглобулин, введение таких моноклональных антител человеку вызывало иммунную реакцию отторжения вследствие выработки антител против иммуноглобулинов мыши, проявлявшуюся в виде тяжелых аллергических реакций и приводящую к инактивации моноклональных антител. В 1988 г. Грэг Винтер разработал специальную методику химеризации и гуманизации моноклональных антител, что в основном снимало проблему иммунного ответа на введение антител больному с терапевтическими или диагностическими целями [2]. Антитела, в которых некоторая часть белков животного происхождения заменялась белковыми компонентами человека, получили название химерных антител. В химерных антителах антиген-связывающие части (вариабельные области) – мышного происхождения, эффекторная часть (константная или Fc-область) представляет собой фрагменты из иммуноглобулина человека. В случае же не просто химерных, а гуманизированных моноклональных антител, мышный фрагмент антиген-связывающей области еще более редуцирован непосредственно до антиген-связывающего сайта (гипервариабельный участок или локус). В настоящее время химеризация или гуманизация моноклональных антител осуществляется с помощью инновационной рекомбинантной ДНК-технологии, принципиально улучшающей их переносимость и позволяющей использовать естественные эффекторные механизмы иммунной системы для разрушения клеточных мишней, покрытых моноклональными антителами [3]. Методические подходы к созданию и проектированию различных композиций моноклональных антител представляют собой широко и интенсивно развивающуюся область человеческого знания.

На современном этапе созданы десятки тысяч высокоаффинных антител, связывающихся с белками, углеводами, нуклеиновыми кислотами, а также низкомолекулярными антигенами. На их основе получены коньюгаты с различными функциональными соединениями, токсинами, ферментами, магнитными частицами, радиоактивными и рентгеноконтрастными атомами и т. п. Эти коньюгаты находят широчайшее применение в научных исследованиях, медицине, ветеринарии. Описаны примеры получения с помощью указанной технологии антител, обладающих каталитической активностью, так называемых «абзимов» (*abzyme от англ. antibody и enzyme*).

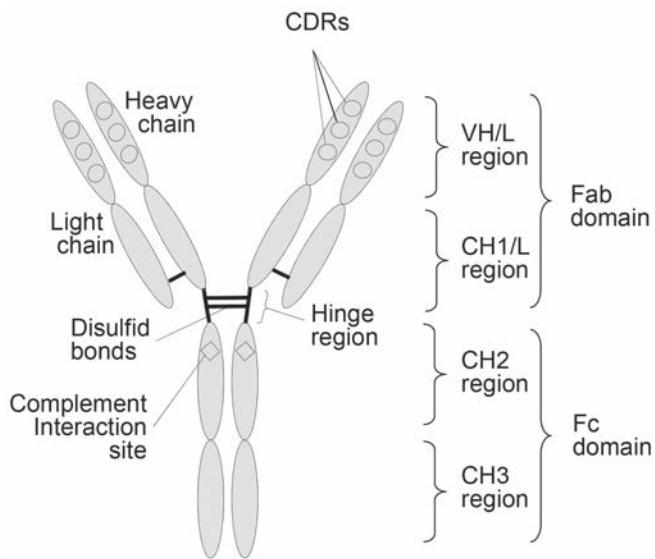
Для противоопухолевого или антилейкемического лечения моноклональные антитела могут использоваться непосредственно, как ни с чем неконьюгированные молекулы или как иммуноконьюгаты. В обоих случаях антитела связываются с определенным антигеном, в случае острой лимфобластной лейкемии (ОЛЛ) – с антигенами типичными для предшествен-

ников В-лимфоцитов или Т-лимфоцитов. В случае применения неконьюгированных антител за антилейкемическую активность ответственны индуцированные антителами физиологические иммунные механизмы. Иммуноконьюгаты доставляют токсичные вещества непосредственно в презентующую антиген клетку-мишень. Несколько токсинов уже были использованы в качестве таких цитостатических препаратов, в частности бактериальные токсины и радионуклиды [4]. Очевидно, что оптимальная активность неконьюгированных антител будет в том случае, если комплекс антиген-антитело остается на поверхности клеток-мишней и соответственно будет подвергнут воздействию иммунных эффекторных механизмов. Напротив антилейкемическая активность иммуноконьюгатов будет значительно выше, если комплекс быстро усваивается клеткой (интернализируется), вызывая максимально токсические эффекты непосредственно внутри клетки. Был проверен цитотоксический эффект иммуноконьюгатов анти-CD19 в сравнении с анти-CD22. Анти-CD22-комплекс был интернализирован в намного более высокой степени и вызвал намного более высокую цитотоксичность. Следовательно, CD22 – наиболее подходящая мишень для технологии иммуноконьюгатов, тогда как CD19 – лучший выбор для неконьюгированных антител, эксплуатирующих физиологические механизмы иммунной системы [5, 6]. Выбор соответствующего антигена-мишени зависит, кроме того, от уровня и интенсивности экспрессии антигена на клетке-мишени и экспрессии на других неопухолевых клетках и тканях.

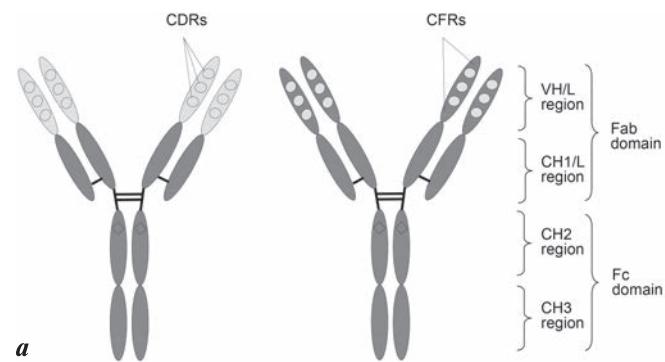
Среди изотипов иммуноглобулинов класса G (IgG) антитела IgG1 и IgG3 вызывают наилучшую активацию антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC*) и комплемент-зависимой цитотоксичности (*complement dependent cytotoxicity – CDC*) и поэтому наиболее предпочтительны для создания неконьюгированных цитотоксических моноклональных антител. Напротив, IgG2 и IgG4 – подходящие изотипы для блокирования связывающего эпигопта, индуцируя интернализацию комплекса или показывая агрессивную активность [7].

Множество антигенов экспрессируется на поверхности и в цитоплазме лимфобластных лейкемических клеток и определяют иммунологическую характеристику лейкемии [8]. Среди антигенов, специфичных для предшественников В-лимфоцитов, высокий уровень экспрессии наблюдается для CD79a, CD19 и CD22 при всех вариантах В-линейной ОЛЛ. В то же время CD10 и CD21 присутствуют в более чем 95 % случаев common и пре-В-ОЛЛ, но не в случае про-В-лейкемии. CD20 экспрессируется только в 10–35 % случаев В-линейной лейкемии. Среди антигенов Т-клеточной линии только CD2, CD5 и CD7 рассматриваются как пан-Т-клеточные маркеры, экспресси-

руемые на всех стадиях созревания от про-Т-клеточных стадий в костном мозге и затем от промежуточных тимусных фаз развития до зрелых Т-лимфоцитов. Проблема в том, что CD3 как часть Т-лимфоцитарного рецепторного комплекса экспрессируется на цитоплазматическом уровне во время всех стадий Т-клеточной дифференцировки, и только в зрелых Т-лимфоцитах этот антиген презентуется на поверхности. При Т-ОЛЛ CD7 и цитоплазматический CD3 можно было бы рассматривать как надежно экспрессируемые антигены при всех подтипах Т-клеточной лейкемии, тогда как CD1, CD2, CD5, CD4, CD8 и CD25 непостоянно экспрессируются среди различных подтипов и клонов и поэтому менее подходящи для системной иммунотерапии [9]. Теоретически CD3, CD5, CD7 и CD25 быстро интернализуются после связывания с антителами и поэтому эти клетки являются наиболее подходящими мишениями. CD4, CD8 и частично CD2 едва интернализуются и таким образом являются особенно подходящей мишенью для неконьюгированных антител, вызывающих ADCC и CDC [10]. CD52, CD45 и HLA-DR высоко экспрессируются на почти всех лейкемических клетках. Но они также презентуются на многих других гемопоэтических клетках и таким образом не могут считаться селективными для антилейкемической терапии (рис. 1 и 2).

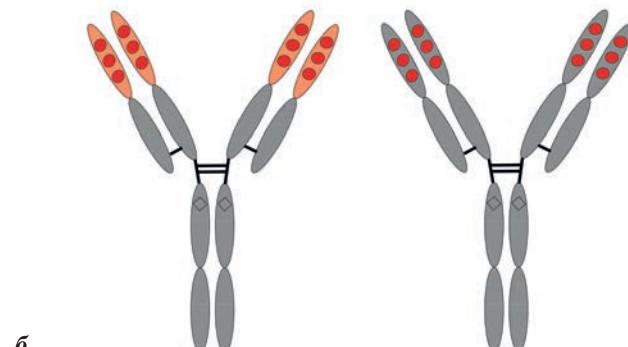


**Рис. 1. Структура IgG-антитела.** Легкая цепь состоит из вариабельной (VL) и константной (CL) областей. Тяжелая цепь состоит из вариабельной области (VH) и 3 константных областей (C1–3). С2-регион содержит места взаимодействия с комплементом. С2- и С3-домены 2 тяжелых цепей формируют Fc-домен. Вариабельные области содержат антиген-специфичные определяющие комплементарность регионы (CDR) или так называемые гипервариабельные области. V- и CL/C1-области формируют Fab-домен, который связывается с Fc-доменом с помощью гибкого шарнирного участка. Две пары тяжелых и легких цепей связаны между собой дисульфидными связями



## Создание моноклональных антител

химерные(мыши/человек-chi/xi)      гуманизированные(-hu/zu)



б

**Рис. 2. а – химерное антитело:** константная область человеческая (темно-серый), вариабельный регион мышиный (светло-серый); **б – гуманизированное антитело:** константная область и сохраняющиеся каркасные области (CFRs) вариабельного региона человеческие. Только определяющая комплементарность область (CDR) или так называемые гипервариабельные области, мышиные

## Механизмы действия эффекторных клеток иммунной системы

Эффекторные клетки иммунной системы, экспрессирующие антитела к Fc<sub>γ</sub>-рецепторам и способные индуцировать антитело-зависимый противоопухолевый эффект, включают натуральные киллеры (NK-клетки), моноциты/макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки (DC). Это происходит с помощью множества антитело-зависимых функций, включая прямое уничтожение покрытых антителами клеток-мишеней путем лизиса, апоптоза и фагоцитоза, или опосредованные эффекты, такие как выделение цитокинов/хемокинов и поддержка адоптивного иммунного ответа [11]. В то время как Fc<sub>γ</sub>RIIIa и Fc<sub>γ</sub>RIIa способствуют развитию активирующих эффектов, Fc<sub>γ</sub>RIIb, экспрессирующиеся на нейтрофильных гранулоцитах и моноцитах, опосредуют ингибирование активности. Высокое соотношение Fc<sub>γ</sub>RIIa/b имеет важное значение для оптимальной активности антител [12, 13]. Имеется много доказательств, полученных на экспериментальных

моделях, что цитокины могут модулировать Fc $\gamma$ R-опосредованную противоопухолевую активность. В попытке избежать системных побочных эффектов исследуются возможности локального применения цитокинов [14].

#### *NK-клетки*

NK-клетки лучше всех оценены среди противоопухолевых эффекторов, вероятно, потому, что их активность легко измерить с помощью наиболее часто используемых ADCC-анализов. NK-клетки имеют уникальное отличие в том, что они обычно экспрессируют только активирующий рецептор Fc $\gamma$ RIIIa и не подлежат регулированию ингибирующим рецептором Fc $\gamma$ RIIb. Основными проявлениями Fc $\gamma$ R-индуцированной активности NK-клеток являются цитолиз клеток-мишней посредством выделения лизических гранул или апоптоз, связанный с секрецией лигандов семейства TNF (например, TNF, FasL) [15]. Они также являются мощными производителями других цитокинов, таких как интерферон- $\gamma$ . NK-клетки регулируются рядом активирующих рецепторов, таких как NKG2D, и ингибирующих рецепторов семейства Ig-подобных рецепторов киллерных клеток (killer Ig-like receptor (KIR)). KIRs подавляют уничтожение при взаимодействии с аутологичными (собственными) молекулами класса I главного комплекса гистосовместимости (МНС) на нормальных клетках. Клетки-мишени, лишенные совместимых МНС, могут быть атакованы NK-клетками путем связывания с активирующими NK-рецепторами, создавая так называемую парадигму «отсутствия своего» функции NK-клеток. Наличие активирующего рецептора Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) на опсонизированных клетках-мишнях может частично перекрывать ингибирующий сигнал KIR, приводя к уничтожению даже аутологичных клеток. Интересно отметить, что дополнительное уничтожение можно наблюдать при сочетании анти-KIR- или анти-МНС-антител с противоопухолевыми антителами [11].

#### *Макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки*

Все клетки миелоидной линии, включая моноциты/макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, экспрессируют Fc $\gamma$ RIIIa и, по крайней мере, один сплайс-вариант ингибирующего рецептора Fc $\gamma$ RIIb. Моноциты/макрофаги и дендритные клетки также экспрессируют Fc $\gamma$ RIIIa и Fc $\gamma$ RI в зависимости от их источника и состояния активации [13, 16]. Нейтрофилы экспрессируют Fc $\gamma$ RIIIb скорее, чем Fc $\gamma$ RIIIa и Fc $\gamma$ RI, при активации G-CSF [17–19]. Макрофаги и нейтрофилы являются классическими фагоцитами и могут фагоцитировать опсонизированные клетки-мишени с помощью вовлечения Fc $\gamma$ Rs. Они также могут индуцировать апоптоз клеток-мишней путем выделения промежуточных соединений химически

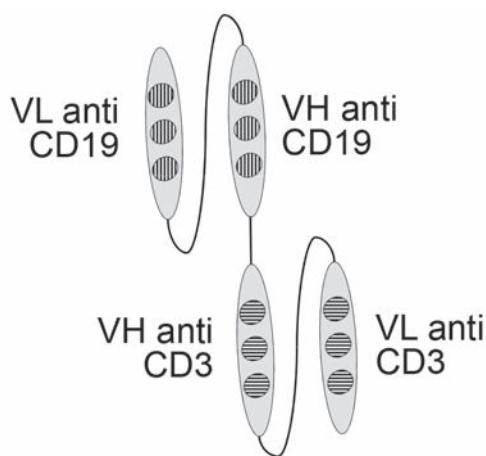
активных азота и кислорода или лизировать их, выделяя содержимое цитолитических гранул. Кроме того, макрофаги и дендритные клетки действуют как профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК). Fc $\gamma$ R-опосредованный фагоцитоз, приводя к деструкции клеток-мишней, может также способствовать потенциально более мощному противоопухолевому эффекту, известному как «кросс-прайминг» (cross-priming). Эти клетки представляют опухолевые антигены на поверхности класса I МНС, тем самым приобретая способность активировать Т-клетки. Кросс-прайминг может активировать цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs), которые распознают комплекс МНС/опухолевый антиген, в конечном итоге приводя к атаке на опухолевые клетки. Этот эффект, катализируемый противоопухолевыми антителами, может теоретически приводить к долговременному адаптивному противоопухолевому иммунитету и длительной ремиссии. Действительно, такими эффектами иногда объясняется долговременный ответ, наблюдаемый у пациентов с лимфомой после терапии анти-CD20-антителами (ритуксимаб) [20, 21].

#### *Цитотоксические Т-клетки*

Цитотоксические Т-клетки являются важными эффекторными клетками иммунной системы для контроля опухоли. Они могут распознавать чужеродные антигены, представленные молекулами МНС класса I, и индуцировать лизис подозрительной клетки-мишени путем продукции перфорина, повреждающего клеточную мембрану, или путем экспрессии про-апоптотического Fas-лиганда и TNF- $\alpha$ . Однако они не участвуют в опосредованном антителами иммунном ответе, так как не имеют Fc-рецептора. Биспецифические антитела, направленные против специфического антигена Т-клеток (например, CD3) и специфического антигена-мишени (например, CD19), связывают Т-клетки с клетками-мишнями и тем самым могут индуцировать клеточную гибель, опосредованную Т-клетками, и, возможно, Т-опосредованный опухолевый иммунитет (рис. 3).

#### *Активность неконъюгированных антител*

Как правило, антитело само по себе не вызывает гибель клеток-мишней, а маркирует клетки, которые другие компоненты или эффекторные клетки иммунной системы должны атаковать, или оно может инициировать сигнальные механизмы в клетках-мишнях, что приводит к саморазрушению клеток. Первые два атакующих механизма называются антитело-опосредованной CDC, ADCC и антитело-зависимым клеточно-опосредованным фагоцитозом (ADCP). ADCC предполагает распознавание антител иммунными клетками и либо путем прямого взаимодействия, либо через привлечение других типов клеток уничтожение



**Рис. 3.** Биспецифическое антитело MT103 (Blinatumomab). Соединение состоит из одноцепочечного антитела, 2 Fv-доменов с вариабельными regionами легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, специфичными к CD19 и CD3, которые связаны через глицин-сериновый «мостик»

клеток-мишеней. Эффективность ADCC и ADCP зависит от иммунного статуса реципиента и наличия макрофагов и NK-клеток.

CDC представляет собой процесс, при котором активируется каскад различных белков системы комплемента, как правило, когда несколько IgG находятся в непосредственной близости друг от друга, или с прямым цитотоксическим, осуществляемым мембраноатакующим комплексом (MAC), или с непрямым цитотоксическим эффектом, вовлекающим другие эффекторные иммунные клетки в этом месте. Имеются успешные работы по оптимизации взаимодействий моноклональное антитело/комплемент и активности комплемента в целях усиления противоопухолевого потенциала моноклональных антител [22, 23]. Однако точная роль CDC в противоопухолевой активности моноклональных антител нуждается в уточнении.

Актуальными являются работы по модификации Fc-домена в целях повышения сродства антитела к Fc $\gamma$ -рецепторам эффекторных клеток иммунной системы, чтобы улучшить противоопухолевое действие неконъюгированных моноклональных антител [11, 24]. Лучшая афинность может быть достигнута селективно для специфического Fc $\gamma$ -IIIa-рецептора NK-клеток (CD16), что приводит к прямому увеличению NK-опосредованной цитотоксичности, или для специфического Fc $\gamma$ -IIIa-рецептора макрофагов (CD32), что увеличивает активацию АПК и, возможно, адаптивный Т-клеточный иммунитет [25, 26]. Например, CD20-моноклональные антитела с увеличенной афинностью к CD16 вызывают ADCC при более низких концентрациях и большую ADCC и активацию NK-клеток на уровне насыщения антител, чем немодифицированные антитела [27].

### Биспецифические антитела

Биспецифические антитела – это искусственно созданные соединения с вариабельными regionами против 2 различных специфических антигенов. Создание таких антител основывается на элементах моноклональных антител, включая вариабельную и неизменную части легких и тяжелых цепей, связанных друг с другом различным образом. В частности, привлекательными являются так называемые биспецифические Т-клеточные антитела (bispecific T-cell engaging antibodies (BiTEs)). Они связывают цитотоксические Т-клетки через анти-CD3-часть с опухолевым антигеном и индуцируют цитотоксическую активность против клеток-мишеней [28]. Этот эффект может быть продемонстрирован и для МНС класса I-позитивных и негативных клеток-мишеней, отражая механизм, обходящий механизмы ускользания опухолевых клеток от иммунного контроля. Наличие иммунологических синапсов может быть продемонстрировано во время цитолитического процесса, доказывающего скорее физиологическую иммунную реакцию, опосредованную антителами [29]. Биспецифическое антитело против CD19 и CD3 способно связывать CD3-позитивные Т-клетки с CD19-позитивными клетками неходжкинской лимфомы (НХЛ) или лейкемии и индуцировать существенную цитотоксичность и Т-опосредованный противоопухолевый иммунитет (см. рис. 3) [30, 31].

Были предприняты и некоторые другие подходы с биспецифическими антителами, а именно: биспецифическое антитело против 2 антигенов В-клеточных НХЛ/лейкемии (CD19/CD22) имеет более высокую активность против В-клеточных неоплазий, чем одиночные моноклональные антитела [32].

### Номенклатура моноклональных антител

Номенклатура моноклональных антител была установлена организацией Adopted Name Council США (<http://www.ama-assn.org>). Все названия моноклональных антител (moAbs) начинаются с вариабельного префикса, определяющего отдельный препарат, такого как ри- для ритуксимаба или эпра- для эпратузумаба; далее следует аффикс, определяющий клиническую мишень (-ту(м) – для опухоли, -ли(м) – для иммунной системы, -ци(р) – для сердечно-сосудистой системы); далее аффикс, определяющий происхождение антитела (-о – мышью, -у – человеческое, -хи – химерное, -цу – гуманизированное), далее суффикс маб для моноклональных антител. Конъюгат, такой как токсин или радионуклид, добавляется в качестве второго слова; например, озогамицин для токсина калихеамицина (гемтузумаб озогамицин – Mylotarg<sup>®</sup>), или тиукситан как хелатор для иттрия-90 (<sup>90</sup>Y-Ибритумомаб тиукситан – Zevalin<sup>®</sup>) [33].

## В-линейно специфические антитела

### CD10

CD10, общий антиген острой лимфобластной лейкемии (CALLA), в контексте других тканей называемый неприлизин (Neprilysin), является цинк-зависимой металлопротеиназой, которая разрушает ряд небольших секрецируемых пептидов. Одним из них является амилоид бета-пептид, чье аномальное сворачивание и агрегация в нервной ткани рассматривается как причина болезни Альцгеймера. CD10 синтезируется в виде мембранных белка, эктодомен которого транспортируется из аппарата Гольджи на поверхность клетки. Неприлизин экспрессируется на различных органах и тканях, включая почки, легкие, нервные и стromальные клетки. Поэтому он не подходит в качестве мишени специфической антилейкемической терапии. Некоторые исследователи используют анти-CD10-антитела для *ex vivo* очистки аутологичных клеток перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [34].

### CD19

#### Биологические характеристики антигена CD19

CD19 представляет собой 95-кДа трансмембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, содержащий 2 внеклеточных иммуноглобулин-подобных домена и цитоплазматический «хвост». CD19 экспрессируется на В-клетках, дендритных и фолликулярных клетках. В В-клеточной линии CD19 определяется на ранних пре-В-клетках от момента реаранжировки гена тяжелых цепей до дифференцировки в плазматические клетки, исчезая на стадии зрелых плазматических клеток. CD19 взаимодействует с CD77, участвуя в образовании герминативных центров, хоуминге В-клеток и апоптозе. Он специфичен для В-линии и выполняет роль позитивного регулятора передачи сигналов В-клеточного рецептора вместе с CD21 и CD81. CD19 является критической молекулой сигнальной трансдукции, которая регулирует развитие В-лимфоцитов, их активацию и дифференцировку. Сигнальный комплекс, состоящий из антигенов CD19/CD21/CD81/CD225 (Leu-13) модулирует пороговое значение для рецептора В-клеточного антигена (BCR). CD21 с помощью активации комплемента позволяет CD19 перекрестно связываться с BCR после предварительного распознавания иммуногена системой комплемента, уменьшая таким образом количество молекул В-клеточного рецептора, которые должны быть связаны для активации В-клеток. Следовательно, CD19 действует как BCR ко-рецептор. Интернализация CD19 после связывания антитела, вероятно, является умеренной и существенно не уменьшает подавление опухолевых клеток эффекторными клетками [35–38].

#### Доклиническое и клиническое использование анти-CD19-моноклональных антител

CD19 является привлекательной мишенью для терапии опухолей лимфоидного происхождения из-за своей высокой экспрессии на большинстве (> 90 %) клеток ОЛЛ из В-клеток предшественников и НХЛ. Экспрессия CD19 на мембране ниже по сравнению с CD20, но в процессе созревания В-клеток начинается раньше и сохраняется дольше [39]. На протяжении более 20 лет CD19 изучался в качестве мишени для иммунотерапии, и несколько CD19-специфических антител были опробованы для лечения В-линейных злокачественных опухолей *in vitro*, на мышиных моделях и в клинических испытаниях (табл. 1).

#### Неконьюгированные анти-CD19-моноклональные антитела

В исследованиях на трансгенных мышиных моделях была показана эффективная деплеция немодифицированными анти-CD19-антителами CD19-позитивных В-клеток и клеток злокачественных CD19-позитивных В-клеточных лимфом/лейкемий главным образом за счет Fc-receptor-γ (FcRγ)-опосредованной активации макрофагов (ADCP). При этом подавление В-клеток было в 2 раза более длительным, чем при использовании анти-CD20-моноклональных антител, приводя к потенциально более серьезному дефициту иммуноглобулинов после эффективной терапии анти-CD19 [40, 41]. При использовании мышиных анти-CD19-моноклональных антител был достигнут кратковременный положительный эффект в лечении пациентов с рефрактерными В-клеточными лимфомами [42]. Было предпринято несколько попыток улучшения ADCC и ADCP путем модификации Fc-домена анти-CD19-моноклональных антител, при которой клеточная цитотоксичность может быть повышена в 100–1000 раз по сравнению с обычными антителами [36]. Гуманизированное антитело с модифицированным Fc-доменом XmAb®5574 разработано фирмой Xencor и находится на доклинической фазе испытаний.

#### Лекарственные коньюгаты CD19-антител

CD19 используется в качестве мишени для комплекса антитело–лекарственное средство. Попытка использования мышьего анти-CD19 mAb, связанного с ингибитором синтеза белка рицином, у пациентов с CD19-позитивными рецидивирующими/рефрактерными НХЛ, хроническими лимфолейкозами (ХЛЛ) и ОЛЛ показала выполнимость и клиническую эффективность в I фазе исследований как при болюсном, так и при непрерывном введении. Однако во II фазе этот эффект не наблюдался. Это объясняется

Таблица 1. Моноклональные антитела, направленные против CD19. Характеристики и стадия разработки

Соединение	Мишени	Вид	Характеристики	Исследования	Ссылки
<b>Неконъюгированные</b>					
XmAb5574 (Xencor Inc.)	CD19	Мышиное гуманизированное	Fc-модифицированное, гуманизированное анти-CD19, индуцирует ADCC, CDC	Ксенотрансплантационные модели	36
<b>Биспецифические</b>					
DT2219	CD19, CD22	Мышиное	Одноцепочечное, биспецифическое анти-CD19/CD22, связанное с дифтерийным токсином	Ксенотрансплантационные модели	32
Sctb ds [19 × 16 × 19]	CD19, CD16	Мышиное	Тройное одноцепочечное Fv, 2 дистальных Fv анти-CD19, 1 центральное анти-CD16	Ксенотрансплантационные модели	55
Blinatumomab (Amgen®)	CD19, CD3	Мышиное	Одноцепочечное, биспецифичное анти-CD19/CD3	Клинические исследования фазы I/II	30
<b>Иммуноконъюгаты</b>					
Анти-B4-рицин	CD19	Мышиное	Анти-CD19 + рицин	Клинические испытания фазы I/II	43, 44
Ida-anti-CD19	CD19	Мышиное	Анти-CD19 + идарубицин	Ксенотрансплантационные модели	45
Anti-CD19-липосомальный DNR	CD19	Мышиное	Анти-CD19 + липосомальный даунорубицин	Ксенотрансплантационные модели	6, 46
Anti-CD19 Pseudomonas toxin A	CD19	Мышиное	Анти-CD19 одноцепочечное Fv + экзотоксин A синегнойной палочки	Ксенотрансплантационные модели	47
scFvCD19: sTRAIL	CD19	Мышиное	Анти-CD19 одноцепочечное Fv + TRAIL. Индукция апоптоза	Ксенотрансплантационные модели	50

Примечание. Fv – вариабельный регион; TRAIL – связанный с TNF апоптоз-индуцирующий лиганд.

использованием чистого мышиного антитела и формированием человеческих антимышинных антител (HAMA) у значительной части пациентов [43, 44]. Конъюгат анти-CD19-идарубицин на мышевой модели оказывал более выраженный антилейкемический эффект и был менее токсичен, чем при введении аналогичной дозы неконъюгированного идарубицина [45]. Кроме того, было продемонстрировано, что липосомальная форма даунорубицина (DNR) проявляет более высокую антилейкемическую активность у мышей при конъюгации с анти-CD19 по сравнению с анти-CD20. Это связано с более быстрой интернализацией CD19 и высвобождением препарата главным образом внутри клетки. Этот эффект не характерен для липосомального винкристина (VCR), а комбинация конъюгатов анти-CD19-липосомальный DNR и анти-CD20-липосомальный VCR приводит к наилучшему антилейкемическому эффекту [46]. В другом доклиническом испытании был использован комплекс одноцепочечного Fv-фрагмента анти-CD19 с производным токсина А синегнойной палочки, что

позволило добиться существенного противоопухолевого действия при В-клеточных новообразованиях на мышевых моделях и *in vitro* [47]. Однако интернализация комплексов CD19-антитело по-прежнему ниже по сравнению с CD22 и отрицательно коррелирует с ко-экспрессией CD21 [48]. Другая комбинация из агента дестабилизирующего микротрубочки (монометиловый ауристатин Е (MMAE)), конъюгированного с гуманизированным анти-CD19-антителом hBu12 с помощью протеаза-чувствительных валин-цитрудлиновых (vc) дипептидных связей смогла преодолеть ингибирующее влияние CD21 на активность анти-CD19 и продемонстрировала хороший противоопухолевый эффект в клетках лимфомы, рефрактерной к терапии ритуксимабом [49]. С целью инициировать выборочный апоптоз в CD19-позитивных клетках-мишениях TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL) был соединен с CD19-специфичным одноцепочечным Fv-антителным фрагментом (scFv), что привело к образованию соединения scFvCD19: sTRAIL. Оно было способно индуцировать апоптоз

в нескольких CD19-позитивных опухолевых клеточных линиях, не затрагивая нормальные клетки крови. Эффект может быть усилен за счет одновременного применения вальпроевой кислоты (VPA) или циклоспорина А. Воздействие на клетки острой В-лимфобластной лейкемии и хронической В-лимфоцитарной лейкемии, полученных от пациентов, привело к выраженному противоопухолевому эффекту [50].

Однако было показано, что внутриклеточная доставка токсических соединений с помощью CD22 является гораздо более эффективной, чем с помощью CD19. Таким образом, приоритетным стало развитие неконьюгированных анти-CD19-антител, тогда как CD22 был выбран в качестве более подходящей мишени для иммунотоксина [4].

*Биспецифические антитела, включающие анти-CD19*

Биспецифические анти-CD19/анти-CD22-антитела, связанные с дифтерийным токсином (DT2219), более эффективны в терапии В-клеточной лейкемии/лимфомы на мышиной модели в сравнении с воздействием каждого антитела, связанного с токсином, по отдельности [32]. Биспецифическое антитело MT103 (blinatumomab, AMGEN), имеющее мишенью CD19 и CD3, тем самым вовлекая в процесс Т-клетки, имеет высокую активность против клеток В-клеточной лимфомы/лейкемии при использовании в низких дозах *in vitro* и *in vivo* [51]. Соединение состоит из одной цепи антитела, двух Fv-доменов, связанных через Gly-Ser мостик (см. рис. 3). В клинических исследованиях оно применялось внутривенно в виде продленной инфузии в течение нескольких недель, что обеспечивает постоянную концентрацию активной субстанции [30, 31]. При его применении противоопухолевый эффект был выше, чем при терапии ритуксимабом и не уменьшался при добавлении дексаметазона [52, 53]. Кроме того, блинатумомаб вызывал редукцию лейкемических клеток ниже предела обнаружения у взрослых пациентов с ОЛЛ, у которых сохранялась минимальная остаточная болезнь (MRD) после химиотерапии [54]. По аналогии было разработано антитело, взаимодействующее с NK-клетками, на основе цепи связанной с двумя анти-CD19-доменами и одним центральным анти-CD16-доменом. Авидность к CD19 была в 3 раза больше и сопоставимая ADCC могла быть достигнута при концентрации в 10–40 раз ниже, чем при применении биспецифического CD19/CD16-антитела, содержащего только один анти-CD19-домен [55].

### Блинатумомаб

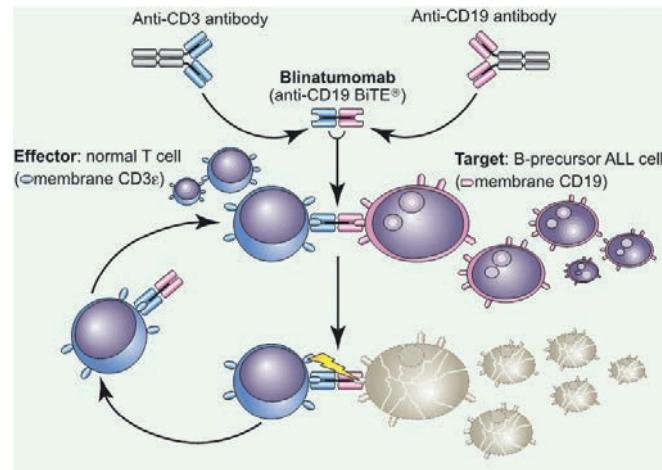
Блинатумомаб представляет собой 55 кДа белок, который состоит из 2 одноцепочечных антител (scFvs) к CD19 и CD3, которые соединены с помощью гибко-

го «мостика» [56, 57]. Блинатумомаб был разработан фирмой Micromet, а его клинические исследования I фазы при НХЛ начались в 2004 г. [58]. Он был одобрен FDA для лечения ОЛЛ из В-клеток-предшественников 3 декабря 2014 г. Это биспецифическое антитело может соединять поликлональные Т-клетки и CD19-экспрессирующие В-клетки и удерживать Т-клетки и злокачественные В-клетки в непосредственной близости. Как следствие, это вызывает уничтожение злокачественных В-клеток [57]. Было обнаружено, что цитотоксичность, модулируемая как блинатумомабом, так и ритуксимабом, приводит к мощной активации прокаспаз 3 и 7 в клетках-мишениях, что может привести к индукции гранзим-опосредованной апоптотической гибели клеток [53]. Хотя сравнительные исследования показали, что цитотоксическая активность, вызванная блинатумомабом с Т-клетками, значительно больше, чем ADCC, вызванная ритуксимабом, сочетание ритуксимаба и блинатумомаба повышает активность ритуксимаба, особенно при низких соотношениях клетки-эффекторы/клетки-мишени и при низкой концентрации антител [53]. В исследованиях *in vitro* блинатумомаб был культивирован совместно с NALM-6 – CD19-экспрессирующей клеточной линией пре-В-лимфомы и CD8-экспрессирующими Т-клетками. В результате он увеличивал клеточный контакт между Т-клетками и NALM-6-клетками и увеличивал апоптоз и лизис клеток NALM-6 [56, 57]. Лизис клеток не наблюдалось в CD19-негативных злокачественных новообразованиях, в частности в клеточной линии 28 эритролейкемии и клеточной линии 29 рака кишечника, что говорит о том, что, связывания блинатумомаба с CD самого по себе недостаточно для активации Т-клеток. При отсутствии экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости класса I, Т-клеточно-опосредованный лизис клеток сохранялся [56, 57]. Блинатумомаб привлекает все цитотоксические Т-клетки для лизиса опухолевых клеток. Описана элиминация клеток-мишени из крови у пациентов с НХЛ, получавших низкие дозы препарата – 0,005 мг/м<sup>2</sup>/сут. И парциальная, и полная регрессия опухоли впервые обнаружены при дозе 0,015 мг, и опухоль регрессировала во всех 7 случаях, в которых доза была 0,06 мг. Кроме того, блинатумомаб может вызывать клиренс опухолевых клеток из костного мозга и печени [30]. Было доказано, что “blinatumomab-expanded” Т-клетки (BET), т. е. Т-клетки, несущие на своей поверхности молекулу блинатумомаба, имеют нормальную экспрессию синаптических ингибиторов CD272 и CD279 по сравнению с исходными Т-клетками и могут быть цитотоксичными против CD19-положительных мишней в присутствии блинатумомаба *in vitro*. Было обнаружено, что комбинация BET и блинатумомаба имеет заметный терапевтический эффект на модели человеческой диффузной В-крупноклеточной лимфомы

у NOD-SCID мышей. Таким образом, ВЕТ могут быть определены в качестве терапевтического инструмента для иммунной реконституции в случаях сильно иммуносупрессированных пациентов с ХЛЛ и в комбинации с блинатумомабом могут рассматриваться в качестве противоопухолевой иммунотерапии [59]. У пациентов после начала инфузии блинатумомаба было описано быстрое падение количества периферических Т-клеток, а также экспансия выше базового количества в процессе терапии. Вдобавок связывание блинатумомаба с клетками Т- и Raji лимфомы может приводить к положительной регуляции CD69 на поверхности активированных Т-клеток [60]. У пациентов с ОЛЛ из В-клеток-предшественников, рецидивировавших после трансплантации, которым блинатумомаб вводился в виде 4-недельной продленной внутривенной инфузии в дозе 5–15 мкг/м<sup>2</sup>/сут, бессобытийная выживаемость составила 30 % с медианой наблюдения в 398 дней. При этом главной отмеченной токсичностью были судороги III степени в 1 случае и синдром высвобождения цитокинов III степени в 2 случаях. Было обнаружено, что блинатумомаб может вызывать молекулярную ремиссию у детей с ОЛЛ из В-предшественников, рецидивировавших после трансплантации [61]. В исследованиях II фазы у пациентов с В-линейным ОЛЛ с персистированием/рецидивом MRD было показано, что блинатумомаб может вызывать ответ в 80 % случаев [62]. В исследовании Topp et al. было показано, что при медиане наблюдения 33 мес, безрецидивная выживаемость всей исследуемой когорты из 20 случаев составила 61 %. Вдобавок безрецидивная выживаемость в 9 случаях, когда пациентам проводилась аллогенная ТГСК после терапии блинатумомабом, составила 65 %. Таким образом, было впервые показано, что блинатумомаб может индуцировать долговременную полную ремиссию в случаях В-линейного ОЛЛ с персистирующей или рецидивирующей MRD. Кроме того, блинатумомаб известен как эффективная и хорошо переносимая терапия при MRD-позитивном В-линейном ОЛЛ после интенсивной химиотерапии. Совместное действие Т-клеток и блинатумомаба могут уничтожать резистентные к химиотерапии опухолевые клетки, которые приводят к клиническому рецидиву (рис. 4) [62].

#### Эффективность и безопасность блинатумомаба

Эффективность и безопасность блинатумомаба у взрослых больных с рецидивным/рефрактерным ОЛЛ изучалась в 2 исследованиях: исследовании MT103 206 – открытом одногрупповом исследовании II фазы у взрослых больных, включавшем 36 пациентов, в том числе несколько больных с Ph<sup>+</sup>-лейкозом [64], и пилотном открытом одногрупповом исследовании II фазы у взрослых больных с Ph-негативным ОЛЛ из клеток предшественников В-лимфоцитов, включавшем 189 больных – MT103 211 [65].



**Рис. 4.** Механизм действия блинатумомаба. Блинатумомаб является новым биспецифическим соединением, которое связывается одновременно с нормальными CD3-Т-клетками и CD19-клетками ОЛЛ, создавая плотное межклеточное соединение с развитием в последующем Т-опосредованной цитотоксичности, направленной на CD19-blastные клетки (BiTE-механизм). Препарат активен при очень низкой концентрации, и как только лизис лейкемических клеток-мишеней завершается, комплекс эффектор–блинатумомаб освобождается для того, чтобы начать работать заново. Молекулярная ремиссия наблюдается примерно у 70 % взрослых пациентов с персистенцией MRD при ОЛЛ при использовании блинатумомаба в качестве монотерапии [62], и такие же данные получены при рецидивах ОЛЛ. Профессиональные иллюстрации Paulette Dennis [63]

#### Исследование MT103 206

В эксплоративное исследование блинатумомаба II фазы включались взрослые пациенты, страдавшие рецидивным или рефрактерным ОЛЛ.

Блинатумомаб вводился посредством длительной внутривенной инфузии в течение 28 дней с последующим перерывом длительностью 14 дней. Пациенты, ответившие на данную терапию, имели возможность получить 3 дополнительных цикла терапии либо аллогенную ТГСК.

Основной конечной точкой являлась частота гематологических полных ремиссий (CR) или полных ремиссий с частичным гематологическим восстановлением (CRh). CRh: ≤ 5 % бластов в костном мозге, отсутствуют признаки циркулирующих бластов или экстрамедуллярного поражения, частичное восстановление параметров периферической крови: как минимум тромбоциты > 50 000/мкл; гемоглобин ≥ 7 г/дл и абсолютное количество нейтрофилов > 500/мкл) в течение 2 циклов приема блинатумомаба. Дополнительными конечными точками являлись общая выживаемость и безопасность.

В общей сложности лечение получали 36 пациентов, у 42 % из которых отмечался рецидив заболевания, несмотря на ранее выполненную трансплантацию костного мозга (ТКМ), 6 % пациентов являлись Ph<sup>+</sup>.

В исследовании показана исключительно высокая частота гематологических ремиссий: у 25 (69 %) из 36 пациентов, получавших терапию, были достигнуты CR/CRh. Хотя наибольшие значения частоты ответов отмечались у пациентов с первым рецидивом, противоопухолевые ответы также имели место у 40 % пациентов со вторым рецидивом, либо рефрактерных к терапии 1-й линии, а также у 53 % пациентов, у которых рецидив отмечался после ТКМ. У 22 (88 %) из 25 пациентов с полной ремиссией была достигнута полная молекулярная ремиссия (отсутствие опухолевых клеток по данным полимеразной цепной реакции); при этом 84 % молекулярных ответов отмечалось в течение первых 2 циклов терапии.

#### Исследование MT103 211

Пригодными для включения в пилотное исследование MT103 211 были взрослые больные с Ph-негативным ОЛЛ из клеток предшественников В-лимфоцитов, удовлетворявшие одному из следующих критерии: рецидивный или рефрактерный ОЛЛ, первично-рефрактерный ОЛЛ после индукционной терапии или с продолжительностью первой ремиссии менее 12 мес, или с рецидивом заболевания в течение 12 мес после ТКМ.

Эти подгруппы пациентов с ОЛЛ являются очень тяжелыми для лечения, поскольку больные уже рефрактерны к предшествующему лечению, и к тому же большинство из них уже имеет нарушения функции внутренних органов, связанные с токсичностью предшествующей лучевой терапии или химиотерапии. Продолжение химиотерапии в этой подгруппе пациентов является малоперспективной и сложной задачей.

Исследование MT103 211 явилось наиболее крупным проспективным исследованием блинатумомаба при рецидивном/рефрактерном ОЛЛ из проведенных до настоящего времени. В нем подтверждена высокая антилейкемическая активность блинатумомаба в монотерапии при Ph-негативном рецидивном/рефрактерном В-клеточном ОЛЛ: показана высокая частота (43 %) полных гематологических ремиссий (CR/CRh) в популяции пациентов, отобранных по наличию негативных прогностических факторов. У значительной доли больных, ответивших на терапию, появилась возможность выполнения ТКМ.

Наиболее серьезные нежелательные реакции, которые возникали во время лечения блинатумомабом более чем у 2 % пациентов, включали: неврологические явления, инфекции, синдром высвобождения цитокинов, синдром лизиса опухоли и нейтропению/фебрильную нейтропению. Наиболее распространенными нежелательными реакциями (возникающими у > 20 % пациентов из данных клинических исследований) были: гипертермия, головная боль, утомляемость, тошнота, трепор, гипокалиемия, диарея и озноб. Се-

рьезные нежелательные явления возникали у 65 % больных. Примерно для 50 % пациентов сообщалось о развитии одной или нескольких неврологических нежелательных реакций (включая психические расстройства), в первую очередь с вовлечением центральной нервной системы. Большинство неврологических явлений (> 90 %) были клинически обратимыми.

Учитывая высокую социальную важность и базируясь на данных по эффективности и безопасности, полученных в исследовании MT103 211, препарат блинатумомаб был зарегистрирован в приоритетном порядке регуляторными органами США и ЕС для терапии больных с рецидивирующим или рефрактерным ОЛЛ из клеток предшественников В-клеток, отрицательным по филадельфийской хромосоме.

#### Исследование III фазы TOWER

В рандомизированном, открытом сравнительном исследовании блинатумомаба и стандартной химиотерапии у взрослых больных с рецидивным/рефрактерным ОЛЛ из клеток предшественников В-лимфоцитов III фазы (исследование TOWER) были получены данные о преимуществах блинатумомаба по показателям общего объективного эффекта и безрецидивной выживаемости, в связи с чем исследование было досрочно прекращено по этическим причинам. Первые результаты этого исследования представлены на Европейском гематологическом конгрессе (ЕНА) в июне 2016 г. (табл. 2).

Таблица 2. Первые результаты исследования TOWER

Показатель	Блинатумомаб	Химиотерапия	p
Полная ремиссия	39 %	19 %	< 0,001
Общий ответ (CR/CRh/CRi)	46 %	28 %	0,001
Медиана общей выживаемости	7,8 мес (95 % ДИ: 5,7–10,0)	4,0 мес (95 % ДИ: 2,9–5,4)	0,001

Блинатумомаб является первым внедренным в клиническую практику представителем BiTE-антигенов, которые вовлекают в противоопухолевый ответ собственные Т-клетки пациента, соединяя их со злокачественными В-лимфоцитами. Программа клинических исследований включала больных ОЛЛ из клеток предшественников В-лимфоцитов, а также больных НХЛ. В первых же исследованиях II фазы был показан высокий противоопухолевый ответ, который выражался также в полной эрадикации MRD у 82–88 % пациентов с CR. Эффективность блинатумомаба в отношении MRD явила крайне важным открытием клинических исследований, поскольку больным с полным молекулярным ответом (MRD-негативным) возможно и рекомендуется выполнение ТКМ, результаты

которой в таком случае значительно более успешны и дают пациентам реальный шанс на полное излечение.

Высокая эффективность блинатумомаба в отношении MRD-позитивного ОЛЛ была продемонстрирована в подтверждающем, мультицентровом исследовании II фазы, в которое включались пациенты с уровнем MRD менее 10-4 по данным полимеразной цепной реакции. Частота полных молекулярных ремиссий составила в этом исследовании 80 %, при этом 67 % пациентов была проведена ТКМ.

Кроме того, по данным анализа результатов отдаленной выживаемости пациентов, достигших полной молекулярной ремиссии (MRD-негативности) в исследовании MT103 206, пациенты с рецидивным/рефрактерным ОЛЛ, достигшие полного молекулярного ответа на терапии блинатумомабом, имели длительную общую выживаемость (более 30 мес).

Таким образом, у больных с полным молекулярным ответом блинатумомаб может служить так называемым мостиком к трансплантации (bridge to transplant), выполнение которой на текущий момент дает пациентам с рецидивом ОЛЛ максимальный шанс на излечение.

Большие перспективы имеет применение блинатумомаба в подгруппе пациентов с Ph<sup>+</sup> ОЛЛ, имеющих наиболее неблагоприятный прогноз. По данным мультицентрового исследования II фазы ALCANTARA, частота полных ремиссий (CR/CRh) составила 36 % у больных с Ph<sup>+</sup> ОЛЛ, рецидивом или рефрактерных к ингибиторам тирозинкиназы, из них у 88 % больных достигнута полная молекулярная ремиссия.

С учетом полученных в пилотных исследованиях блинатумомаба данных о высокой эффективности и удовлетворительной переносимости, обширная программа клинических исследований блинатумомаба продолжается. В детской популяции больных с рецидивным или рефрактерным ОЛЛ получены сопоставимые со взрослой популяцией данные по эффективности, что открывает большие перспективы для исследований блинатумомаба в ранних линиях терапии детей с ОЛЛ, в комбинациях с химиотерапией, а также с другими препаратами, воздействующими на иммунные противоопухолевые механизмы (check-point inhibitors etc) у детей и взрослых.

Поиск новых подходов к лечению рецидивов острых лейкозов является важным направлением клинических исследований, назрела необходимость в кардинально новых лечебных подходах, таких как иммунотерапия. Создание инновационных препаратов, воздействующих на различные звенья противоопухолевого иммунитета человека, является новым, перспективным направлением в современной онкоиммунологии.

Препарат блинатумомаб является биспецифическим активатором Т-клеток, первым представителем нового класса препаратов BiTE® и представляет собой

антитело-конструкт, селективно связывающеся с антигеном CD19, экспрессируемым на поверхности В-клеток, и антигеном CD3, экспрессируемым на поверхности Т-клеток. Он активирует эндогенные Т-клетки, соединяя CD3 в комплексе Т-клеточного рецептора с CD19 на доброкачественных и злокачественных В-клетках. Опосредованное блинатумомабом образование цитолитического синапса между Т-клеткой и опухолевой клеткой приводит к высвобождению протеолитических ферментов, разрушающих как пролиферирующие, так и покоящиеся клетки-мишени. Блинатумомаб транзиторно активирует повышение экспрессии молекул клеточной адгезии, выработку цитолитических белков, высвобождение воспалительных цитокинов и пролиферацию Т-клеток, и приводит к ликвидации злокачественных CD19<sup>+</sup>-клеток.

В рамках пилотных клинических исследований препарат продемонстрировал высокую эффективность в различных популяциях пациентов с ОЛЛ, в том числе в самых прогностически неблагоприятных подгруппах, что открывает большие перспективы применения в клинической практике, а пациентам с этим тяжелым, до недавнего времени неизлечимым заболеванием, дает надежду на полное излечение.

### Обсуждение

Моноклональные антитела представляют собой новый терапевтический подход в лечении злокачественных опухолей. Механизм действия классической химиотерапии неспецифичен, антитрополиферативный эффект или индукция апоптоза происходят не только в злокачественных, но и в нормальных клетках. Соответственно, должны быть приняты во внимание побочные эффекты. В отличие от этого моноклональные антитела проявляют активность против клеток, экспрессирующих специфический антиген. Чем более избирательно антиген экспрессируется на опухолевых клетках, тем более направленным является цитотоксический эффект. Побочные эффекты зависят от степени экспрессии антигена на здоровых клетках. Для лечения детей с ОЛЛ антитела могут применяться у значительной части пациентов. Предпочтительно, чтобы целевые антигены экспрессировались на всех клонах лейкемических клеток одной иммунологической линии, позволяя проводить систематические проспективные контролируемые исследования.

### Неконъюгированные антитела

Идеальной мишенью для терапии ОЛЛ неконъюгированными моноклональными антителами был бы антиген, который селективно экспрессируется на большинстве лейкемических клонов и не обладает быстрой интернализацией. Лучше всего этим критериям соответствует CD19, определяющийся на высоком уровне почти на всех В-линейных клонах при

ОЛЛ и достаточно долго остающийся на поверхности клетки. В качестве очень многообещающего подхода биспецифическое мышиное одноцепочечное антитело анти-CD19/CD3 MT103 (Blinatumomab, Amgen, Inc.) оказалось весьма эффективным в терапии В-клеточной лимфомы и В-линейных ОЛЛ у детей и взрослых. При монотерапии препарат способен индуцировать продолжительную полную ремиссию у пациентов с IV стадией В-клеточной лимфомы и MRD-негативную ремиссию у больных ОЛЛ, имевших MRD-титр после обычных режимов химиотерапии [30, 54, 62]. Блинатумомаб представляется наиболее перспективным иммунотерапевтическим соединением, завершившим фазу клинических испытаний, для лечения ОЛЛ у детей.

### Заключение

Разработка моноклональных антител для лечения гемобластозов является быстро развивающейся областью науки в основном за счет их применения у взрослых с В-клеточной или периферической Т-клеточной лимфомами. Ряд соединений оказался эффективен так-

же при лечении ОЛЛ у детей. Неконъюгированные гуманизированные антитела обычно не имеют тяжелых острых побочных эффектов и могут использоваться в сочетании с химиотерапией. Терапия иммуноконъюгатами сопряжена с более серьезными осложнениями, и поэтому предпочтительно их применение в виде отдельных агентов или при тщательном подборе комбинаций. Наиболее перспективным соединением для ОЛЛ у детей является биспецифическое Т-клеточное/анти-CD19-антитело блинатумомаб.

Для разработки панели моноклональных антител, эффективных при ОЛЛ у детей и исследования их значения в контексте современных мультимодальных подходов к лечению необходимы хорошо организованные многонациональные исследования I/II и III фаз. В рамках этих исследований предстоит определить оптимальные сроки, дозы и продолжительность лечения при использовании различных моноклональных антител. Моноклональные антитела обладают совершенно иным механизмом антилейкемического действия по сравнению с обычной химиотерапией и, конечно, существенно изменят стратегию лечения детей с ОЛЛ в будущем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–7.
2. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988;332:323–7.
3. Lazar G.A., Desjarlais J.R., Jacinto J. et al. A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. *Mol Immunol* 2007;44:1986–98.
4. Kreitman R.J. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *Bio Drugs* 2009;23:1–13.
5. Du X., Beers R., Fitzgerald D.J., Pastan I. Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. *Cancer Res* 2008;68:6300–5.
6. Sapra P., Allen T.M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res* 2002;62:7190–4.
7. Labrijn A.F., Aalberse R.C., Schuurman J. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol* 2008;20:479–85.
8. Gudowius S., Recker K., Laws H.J. et al. Identification of candidate target antigens for antibody-based immunotherapy in childhood B-cell precursor ALL. *Klin Padiatr* 2006;218:327–33.
9. Bene M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 2005;98:9–21.
10. Preijers F.W., Tax W.J., De Witte T. et al. Relationship between internalization and cytotoxicity of ricin A-chain immunotoxins. *Br J Haematol* 1988;70:289–94.
11. Desjarlais J.R., Lazar G.A., Zhukovsky E.A., Chu S.Y. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today* 2007;12:898–910.
12. van Mirre E., Breunis W.B., Geissler J. et al. Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory Fc gamma RII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines. *Blood* 2006;108:584–90.
13. Pricop L., Redecha P., Teillaud J.L. et al. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* 2001;166:531–7.
14. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:11–22.
15. Kashii Y., Giorda R., Herberman R.B. et al. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 1999;163:5358–66.
16. Boruchov A.M., Heller G., Veri M.C. et al. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 2005;115:2914–23.
17. Michon J.M., Gey A., Moutel S. et al. *In vivo* induction of functional Fc gamma RI (CD64) on neutrophils and modulation of blood cytokine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF (rMetHuG-CSF). *Br J Haematol* 1998;100:550–6.
18. Rech J., Repp R., Rech D. et al. A humanized HLA-DR antibody (hu1D10, apolizumab) in combination with granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a pilot study. *Leuk Lymphoma* 2006;47:2147–54.
19. Dechant M., Bruenke J., Valerius T. HLA class II antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Semin Oncol* 2003;30:465–75.
20. Selenko N., Majdic O., Jager U. et al. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *J Clin Immunol* 2002;22:124–30.
21. Selenko N., Majdic O., Draxier S. et al. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia* 2001;15:1619–26.
22. Idusogie E.E., Wong P.Y., Presta L.G. et al. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol* 2001;166:2571–5.
23. Dall'Acqua W.F., Cook K.E., Damschroder M.M. et al. Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J Immunol* 2006;177:1129–38.
24. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005;310:1510–2.
25. Richards J.O., Karki S., Lazar G.A. et al. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2517–27.
26. Lazar G.A., Dang W., Karki S. et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4005–10.

27. Bowles J.A., Wang S.Y., Link B.K. et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* 2006;108:2648–54.
28. Kufer P., Lutterbuse R., Baeuerle P.A. A revival of bispecific antibodies. *Trends Biotechnol* 2004;22:238–44.
29. Offner S., Hofmeister R., Romaniuk A. et al. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol* 2006;43:763–71.
30. Bargou R., Leo E., Zugmaier G. et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321:974–7.
31. Loffler A., Kufer P., Lutterbuse R. et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000;95:2098–103.
32. Vallera D.A., Todhunter D.A., Kuroki D.W. et al. A bispecific recombinant immunotoxin, DT2219, targeting human CD19 and CD22 receptors in a mouse xenograft model of B-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:3879–88.
33. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. World Health Organ Tech Rep Ser 2008;1–138.
34. Uckun F.M., Kersey J.H., Haake R. et al. Autologous bone marrow transplantation in high-risk remission B-lineage acute lymphoblastic leukemia using a cocktail of three monoclonal antibodies (BA-1/CD24, BA-2/CD9, and BA-3/CD10) plus complement and 4-hydroperoxycyclophosphamide for ex vivo bone marrow purging. *Blood* 1992;79:1094–104.
35. Hasegawa M., Fujimoto M., Poe J.C. et al. CD19 can regulate B lymphocyte signal transduction independent of complement activation. *J Immunol* 2001;167:3190–200.
36. Horton H.M., Bennett M.J., Pong E. et al. Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 2008;68:8049–57.
37. Anderson K.C., Bates M.P., Slaughenhoupt B.L. et al. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984;63:1424–33.
38. Uckun F.M., Jaszcz W., Ambrus J.L. et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* 1988;71:13–29.
39. Tedder T.F., Inaoki M., Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997;6:107–18.
40. Yazawa N., Hamaguchi Y., Poe J.C., Tedder T.F. Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15178–83.
41. Vlasveld L.T., Hekman A., Vyth-Dreese F.A. et al. Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with continuous infusion of low-dose recombinant interleukin-2 in combination with the B-cell-specific monoclonal antibody CLB-CD19. *Cancer Immunol Immunother* 1995;40:37–47.
42. Hekman A., Honselaar A., Vuist W.M. et al. Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother* 1991;32:364–72.
43. Grossbard M.L., Lambert J.M., Goldmacher V.S. et al. Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol* 1993;11:726–37.
44. Multani P.S., O'Day S., Nadler L.M., Grossbard M.L. Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:2599–604.
45. Rowland A.J., Pietersz G.A., McKenzie I.F. Preclinical investigation of the antitumour effects of anti-CD19-idoarubicin immunoconjugates. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:195–202.
46. Sapra P., Allen T.M. Improved outcome when B-cell lymphoma is treated with combinations of immunoliposomal anticancer drugs targeted to both the CD19 and CD20 epitopes. *Clin Cancer Res* 2004;10:2530–7.
47. Schwemmlein M., Stieglmaier J., Kellner C. et al. A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells. *Leukemia* 2007;21:1405–12.
48. Ingle G.S., Chan P., Elliott J.M. et al. High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate. *Br J Haematol* 2008;140:46–58.
49. Gerber H.P., Kung-Sutherland M., Stone I. et al. Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hB12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. *Blood* 2009;113:4352–61.
50. Stieglmaier J., Bremer E., Kellner C. et al. Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:233–46.
51. Molhoj M., Crommer S., Brischwein K. et al. CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis. *Mol Immunol* 2007;44:1935–43.
52. Brandl C., Haas C., d'Argouges S. et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1551–63.
53. d'Argouges S., Wissing S., Brandl C. et al. Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells. *Leuk Res* 2009;33:465–73.
54. Topp M., Goekbuget N., Kufer P. et al. Treatment with Anti-CD19 BiTE Antibody Blinatumomab (MT103 / MEDI-538) Is Able to Eliminate Minimal Residual Disease (MRD) in Patients with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): First Results of An Ongoing Phase II Study. ASH Annual Meeting Abstracts 2008;112:1926.
55. Kellner C., Bruenke J., Stieglmaier J. et al. A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells. *J Immunother* 2008;31:871–84.
56. Hoffmann P., Hofmeister R., Brischwein K. et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Int J Cancer* 2005;115:98–104.
57. Portell C.A., Wenzell C.M., Advani A.S. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B- cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol* 2013;5:5–11.
58. <http://tabs.craic.com/. antibodies>. Therapeutic antibody database 2015.
59. Golay J., D'Amico A., Borleri G. et al. A novel method using blinatumomab for efficient, clinical-grade expansion of polyclonal T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2014;193:4739–47.
60. Klinger M., Brandl C., Zugmaier G. et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell- engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 2012;119:6226–33.
61. Schlegel P., Lang P., Zugmaier G. et al. Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab. *Haematologica* 2014;99:1212–9.
62. Topp M.S., Kufer P., Gökbüget N. et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol* 2011;29:2493–8.
63. Bassan R., Dell'Angelo O., Paolo G.E. Toward victory in adult ALL: blinatumomab joins in. *Blood* 2012;120:5094–5.
64. Topp M.S., Gökbüget N., Zugmaier G. et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014;32:4134–40.
65. Topp M.S., Gökbüget N., Stein A.S. et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015;16:57–66.