

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037548**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.12

(21) Номер заявки
201890131

(22) Дата подачи заявки
2016.06.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛЯЦИЯ И ЛЕЧЕНИЕ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ АНТИТЕЛАМИ, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТ CD38

(31) 62/184,018; 62/249,546; 62/250,566;
62/263,307; 62/331,489

(32) 2015.06.24; 2015.11.02; 2015.11.04;
2015.12.04; 2016.05.04

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/US2016/039165

(87) WO 2016/210223 2016.12.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ахмади Тахамтан (US), Каснёф
Тинекке, Локхорст Хенк М., Мютис
Тюна (NL), Сассер Эми (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20140099254
US-A1-20140356318
US-A1-20150125447

NAJJAR et al. "Abstract P227: Accumulation of MDSC Subsets in Renal Cell Carcinoma Correlates with Grade and Progression Free Survival, and is Associated with Intratumoral Expression of IL-1b, IL-8 and CXCL5", Journal for Immunotherapy of Cancer, 6 November 2014 (06.11.2014), Vol. 2, Pgs. 110-112, entire document

BACHIREDDY et al. "Haematological Malignancies: at the Forefront of Immunotherapeutic Innovation", Nature Reviews Cancer, 1 April 2015 (01.04.2015), Vol. 15, Pgs. 201-215, entire document

YE et al. "Abstract P240: Treg Increases HepG2 Cell Growth by RANK-RANKL pathway", Journal for Immunotherapy of Cancer, 6 November 2014 (06.11.2014), Vol. 2, Pgs. 115-117, entire document

US-A1-20150246123

(57) Изобретение относится к способам иммуномодуляции и лечения пациентов, имеющих солидные опухоли, антителами, которые специфически связывают CD38.

B1**037548****037548****B1**

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способам иммуномодуляции и лечения солидных опухолей антителами, которые специфически связывают CD38.

Предпосылки создания изобретения

Иммунная система жестко регулируется сетью костимуляторных и коингибиторных лигандов и рецепторов. Эти молекулы обеспечивают вторичные сигналы для активации Т-клеток и обеспечивают сбалансированную сеть положительных и отрицательных сигналов для максимизации иммунных ответов против инфекции и опухолей, в то же время ограничивая иммунность против самих себя (Wang et al., (Epub Mar. 7, 2011) J. Exp. Med. 208(3):577-92; Lepenies et al., (2008), Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets, 8:279-288).

Нацеленная на иммунные контрольные точки терапия для лечения солидных опухолей, нацеленная на коингибиторные пути в Т-клетках для стимуляции противоопухолевых иммунных ответов, привела к продвижению в клиническом обслуживании раковых пациентов с применением одобренных средств, таких как анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антитела Ервой® (ипилидумаб), Кейтруда® (пембролизумаб) и ОПДИВО® (ниволумаб). Хотя анти-PD-1/PD-L1 антитела демонстрируют вселяющие надежды клинические ответы у пациентов с множественными солидными опухолями, уровни ответов все еще низковаты и составляют около 15-20% у проходивших предварительное лечение пациентов (Swaika et al., (2015), Mol. Immunol. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.009).

Хотя естественные клетки-киллеры (НК), дендритные клетки (ДК) и эффекторные Т-клетки способны инициировать эффективные противоопухолевые ответы, опухолевые клетки часто индуцируют иммуносупрессивное микроокружение, способствующее развитию иммуносупрессивных популяций иммунных клеток, таких как миелоидные супрессорные клетки (МСК), регуляторные Т-клетки (T_{reg}) или регуляторные В-клетки (B_{reg}), которые являются причиной опухолевой иммунной толерантности и неэффективности иммунотерапевтических схем лечения раковых пациентов и экспериментальных опухолевых моделей.

Таким образом, сохраняется необходимость в разработке новых вариантов раковой иммунотерапии, которые индуцируют адаптивный иммунный ответ против опухолей или нацелены на иммуносупрессивные иммунные клетки.

Изложение сущности изобретения

В изобретении предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное регуляторными Т-клетками (T_{reg}) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное миелоидными супрессорными клетками (МСК) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное регуляторными В-клетками (B_{reg}) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности регуляторных Т-клеток (T_{reg}), включающий приведение T_{reg} в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности миелоидных супрессорных клеток (МСК), включающий приведение МСК в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности регуляторных В-клеток (B_{reg}), включающий приведение B_{reg} в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ усиления иммунного ответа у пациента, включающий введение пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий снижение числа клеток T_{reg} у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий снижение числа миелоидных супрессорных клеток (МСК) у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности иммунных супрессорных клеток, включающий приведение иммунных супрессорных клеток в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего вирусную инфекцию, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано, что медианное число лимфоцитов возрастало у пациентов, восприимчивых к лечению Дарзалексом™ (даратумумабом) в дозировке 8 мг/кг (верхняя линия) или 16 мг/кг (нижняя линия) с течением времени и что число лимфоцитов вернулось к базовому уровню после окончания лечения. Исследование: SIRIUS. По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 и т.д.). SCR: базовый уровень; КЛ: конец лечения; НД: неделя; ПОСТ-НД: после лечения в указанные недели; пост-ПЗ ПН: последующее наблюдение после прогрессирования. Выделенные серым области показывают 25-27% межквартильный размах (MP) для данных по каждому визиту для пациентов с ответом.

На фиг. 2 показано процентное (%) изменение абсолютного числа Т-клеток CD3⁺ по отношению к базовому уровню в периферической крови пациентов, которых лечили Дарзалексом™ (даратумумабом), для каждого отдельного пациента (светло-серые линии). Исследование: SIRIUS (MMY2002). По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 и т.д.). НД: неделя; ПОСТ-НД: после лечения в указанные недели; ПОСТ-ПЗ ПН: последующее наблюдение после прогрессирования. Черной линией показано медианное % изменение для всех пациентов.

На фиг. 3 показано процентное (%) изменение абсолютного числа Т-клеток CD4⁺ по отношению к базовому уровню в периферической крови пациентов, которых лечили Дарзалексом™ (даратумумабом), для каждого отдельного пациента (светло-серые линии). Исследование: SIRIUS. По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 и т.д.). НД: неделя; ПОСТ-ЛЧ: после лечения. Черной линией показано медианное % изменение для всех пациентов.

На фиг. 4 показано процентное (%) изменение абсолютного числа Т-клеток CD8⁺ по отношению к базовому уровню в периферической крови пациентов, которых лечили Дарзалексом™ (даратумумабом), для каждого отдельного пациента (светло-серые линии). Исследование: SIRIUS. По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 и т.д.). НД: неделя; Пре-ПЗ ПН: последующее наблюдение до прогрессирования. Пост-ПЗ ПН: последующее наблюдение после прогрессирования. Черной линией показано медианное % изменение для всех пациентов.

На фиг. 5 показано, что число клеток CD45⁺CD3⁺ (определяемое как процентное содержание лимфоцитов) в аспиратах костного мозга повышалось во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) с течением времени при дозировке 8 или 16 мг/кг. На графике показаны данные по обоим пациентам с ответом и пациентом без ответа, как указано. Исследование: SIRIUS. По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C2D22: цикл 2, день 22 и т.д.). SCR: базовый уровень; Пост-ПЗ ПН1: последующее наблюдение после прогрессирования. Выделенные серым области показывают 25-27% межквартильный размах (MP) для данных по каждому визиту для пациентов без ответа, получавших дозу 8 мг/кг, пациентов с ответом, получавших дозу 16 мг/кг, или пациентов без ответа, получавших дозу 16 мг/кг, соответственно. БО: пациент без ответа; О: пациент с ответом.

На фиг. 6 показано, что число клеток CD45⁺CD3⁺ CD8⁺ (определяемое как процентное содержание лимфоцитов) в аспиратах костного мозга повышалось во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) с течением времени при дозировке 8 мг/кг или 16 мг/кг. На графике показаны данные по обоим пациентам с ответом и пациентом без ответа, как указано. Исследование: SIRIUS. По оси X указано время, выраженное в виде цикла лечения и дней дозирования в пределах каждого цикла (C2D22: цикл 2, день 22 и т.д.). SCR: базовый уровень; ПОСТ-ПЗ ПН1: последующее наблюдение после прогрессирования. Выделенные серым области показывают 25-27% межквартильный размах (MP) для данных по каждому визиту для пациентов без ответа, получавших дозу 8 мг/кг, пациентов с ответом, получавших дозу 16 мг/кг, или пациентов без ответа, получавших дозу 16 мг/кг, соответственно. БО: пациент без ответа; О: пациент с ответом.

На фиг. 7А показано, что соотношение числа клеток CD8⁺/T_{reg} и CD8⁺/CD4⁺ в периферической крови, выраженное в виде медианных значений для всех проходивших лечение пациентов, повышалось с течением времени во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Момент времени: C1D1: цикл 1, день; C3D1: цикл 3, день 1; C4D1: цикл 4, день 1. Исследование: SIRIUS. SCR: базовый уровень.

На фиг. 7В показано, что соотношение числа клеток CD8⁺/T_{reg} в аспиратах костного мозга, выраженное в виде медианных значений для всех проходивших лечение пациентов, повышалось с течением времени во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Момент времени: C1D1: цикл 1, день; C3D1: цикл 3, день 1; C4D1: цикл 4, день 1. Исследование: SIRIUS.

На фиг. 8А показано, что у пациентов с ответом была повышена клональность Т-клеток CD8⁺ по сравнению с пациентами без ответа, определяемая с помощью % изменения в численности (ИБЧ) конкретных клональных клеток. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 8В показана кратность изменения в клональности Т-клеток CD8⁺ у отдельных пациентов до и после лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Пациенты с ответом отмечены звездочкой. Клональ-

ность определяли как кратность изменения в численности (ИБЧ) конкретных клональных клеток. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 8C показано, что у пациентов с ответом (группа А) наблюдалась большее общее размножение репертуара РТК, определяемая по ИБЧ (изменение в численности), по сравнению с пациентами без ответа (группа В). $P=0,037$. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 8D приведена сумма абсолютного изменения в численности (ИБЧ) у пациентов с ответом и без ответа для каждого размноженного Т-клеточного клона. $P=0,035$ между пациентами с ответом (группа А) и без ответа (группа В). Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 8E приведено максимальное ИБЧ единичного Т-клеточного клона у пациентов с ответом (группа А) и без ответа (группа В). Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 8F показано, что у пациентов с ответом (группа А) наблюдалась большее максимальное размножение единичного клона, определяемое по максимальному % ИБЧ, по сравнению с пациентами без ответа (группа В). $P=0,0477$. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 9A показано процентное содержание (%) наивных клеток $CD8^+$ в периферической крови у пациентов без ответа (БО, черные квадраты) и у пациентов, демонстрирующих по меньшей мере минимальный ответ (МО, белые квадраты) на Дарзалекс™ (даратумумаб) на базовом уровне или через 2 недели, 4 недели или 8 недель лечения или после рецидива. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17. $**p=1,82 \times 10^{-4}$.

На фиг. 9B показано процентное содержание (%) центральных клеток памяти (Тем) $CD8^+$ в периферической крови у пациентов без ответа (БО, черные квадраты) и у пациентов, демонстрирующих по меньшей мере минимальный ответ (МО, белые квадраты) на Дарзалекс™ (даратумумаб) на базовом уровне или через 2 недели, 4 недели или 8 недель лечения или после рецидива. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17. $*p=4,88 \times 10^{-2}$.

На фиг. 9C показано процентное увеличение числа рестриктивных по HLA-антигенам класса I Т-клеток $CD8^+$ в периферической крови на базовом уровне или через 1, 4 или 8 недель лечения или после рецидива. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 9D показано, что $CD38$ экспрессируется на низких уровнях в наивных Т-клетках $CD8^+$ и центральных клетках памяти (Тем) $CD8^+$ в периферической крови на базовом уровне или при лечении. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17. СИФ: средняя интенсивность флуоресценции.

На фиг. 10A приведена гистограмма анализа FACS, иллюстрирующая частоту появления T_{reg} ($CD3^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$) (верхняя гистограмма, популяции клеток P4) и частоту появления $CD38^+$ T_{reg} в пределах популяции T_{reg} (нижняя гистограмма, популяции клеток P5) у пациентов с множественной миеломой на базовом уровне. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 10B приведена гистограмма анализа FACS, иллюстрирующая частоту появления T_{reg} ($CD3^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$) (верхняя гистограмма, популяции клеток P4) и частоту появления $CD38^+$ T_{reg} в пределах популяции T_{reg} (нижняя гистограмма, популяции клеток P5) у пациентов с множественной миеломой после лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) приводило к истощению $CD38^+$ T_{reg} . Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 10C приведена частота появления $CD38^{high}CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ T_{reg} у пациентов, проходивших лечение Дарзалексом™ (даратумумабом), на базовом уровне или через 1, 4, 8 недель, после рецидива или в конце лечения через 6 месяцев (КЛ). Частота появления $CD38^{high} T_{reg}$ снижалась вследствие лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) и возвращалась к базовому уровню в КЛ. Ось Y: % $CD38^{high}CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim} T_{reg}$ среди Т-клеток $CD3^+$. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 10D показано соотношение клеток $CD8^+/T_{reg}$ у пациентов с ответом и без ответа базовом уровне, через 1 неделю, 4 недели и 8 недель лечения. Соотношение клеток $CD8^+/T_{reg}$ было значительно выше у пациентов с ответом, чем у пациентов без ответа ($p=0,00955$) на 8 неделю лечения. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 10E показано, что пролиферация эффекторных клеток более эффективно ингибировалась в присутствии $CD38^+ T_{reg}$ по сравнению с $CD38^- T_{reg}$ или отрицательным контролем. Планки погрешностей представляют стандартную погрешность. Звездочками обозначены существенные изменения. Образцы получали от некоторого числа здоровых доноров. Пролиферацию клеток анализировали путем разведения сукцинимидилового сложного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE).

На фиг. 11 показано, что миелоидные супрессорные клетки (МСК) присутствуют у пациентов со множественной миеломой (верхний график, обведенные квадратом клетки), а около половины клеток экспрессировали $CD38$ (средний график, обведенные квадратом клетки). Популяция МСК $CD38^{high}$ была истощена у пациентов, которых лечили посредством одной инфузии Дарзалекса™ (даратумумаба) (нижний график, обведенные квадратом клетки). Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 12 показано, что число МСК $CD38^{high} (CD11b^+HLA-DR^+CD14^+CD33^+CD15^+)$ было снижено у пациентов через 1 неделю, 4 недели или 8 недель лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) по сравнению с базовым уровнем и возвращалось близко к базовому уровню после окончания лечения (КЛ). Пациенты

с рецидивом все еще демонстрировали сниженное число МСК CD38^{high}. Черные квадраты: пациента без ответа; белые квадраты: пациенты по меньшей мере с минимальным ответом на лечение ДарзалексомTM (даратумумабом). Вертикальные линии указывают медианные значения в каждой группе. Пациенты 2, 4, 15, 16 и 17 демонстрировали высокие исходные популяции МСК CD38^{high}. Исследование: подгруппа пациентов GEN501 17.

На фиг. 13 показано, что пациенты с наивысшим числом МСК CD38^{high} (пациенты 2, 4, 15, 16 и 17) демонстрировали наивысшую выживаемость без прогрессирования (ВБП). Эти пациенты демонстрировали либо частичный ответ (ЧО), либо минимальный ответ (МО) на лечение ДарзалексомTM (даратумумабом). СЗ: стабильное заболевание; ПЗ: прогрессирующее заболевание. По оси X показана ВБП для каждого отдельного пронумерованного пациента.

На фиг. 14 показано, что МСК чувствительны к индуцированной ДарзалексомTM (даратумумабом) АЗКЦ. Клетки Daudi использовали в анализе в качестве положительного контроля для клеток-мишеней. Определяли % лизиса клеток.

На фиг. 15А показано, что CD38⁺ V_{reg} были истощены у пациентов, которых лечили ДарзалексомTM (даратумумабом) на 1 неделю, 4 неделю и 8 неделю лечения.

На фиг. 15В показано, что CD38⁺ V_{reg} секретируют IL-10 после стимуляции.

На фиг. 16А показан противовирусный ответ, определяемый по выработке специфического в отношении ЦМВ, ЭБВ и вируса гриппа (ЦЭГ) IFN-γ в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с ОХЧР на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. ОП: оптическая плотность. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ; клетчатый столбец: только аллогенные МКПК. Звездочка указывает на статистически значимое изменение. Пре 4, 8, 10 = неделя 4, 8 или 10 лечения.

На фиг. 16В показан противовирусный ответ, определяемый по выработке специфического в отношении ЦМВ, ЭБВ и вируса гриппа (ЦЭГ) IFN-γ в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с ПР на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. ОП: оптическая плотность. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ; клетчатый столбец: только аллогенные МКПК. Звездочка указывает на статистически значимое изменение. Пре 4, 8, 10 = неделя 4, 8 или 10 лечения.

На фиг. 16С показан противовирусный ответ, определяемый по выработке специфического в отношении ЦМВ, ЭБВ и вируса гриппа (ЦЭГ) IFN-γ в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с РД на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. ОП: оптическая плотность. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ; клетчатый столбец: только аллогенные МКПК. Нз: не значимо. Пре 4, 8 = неделя 4 или 8 лечения.

На фиг. 16D показан противовирусный ответ, определяемый по выработке специфического в отношении ЦМВ, ЭБВ и вируса гриппа (ЦЭГ) IFN-γ в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с МО на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. ОП: оптическая плотность. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ; клетчатый столбец: только аллогенные МКПК. Нз: не значимо. Пре 4, 8 = неделя 4 или 8 лечения.

На фиг. 16Е показано процентное содержание (%) пролиферирующих реактивных в отношении вируса Т-клеток в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с ОХЧР на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ. Звездочка указывает на статистически значимое изменение. Пре 4, 8, 10 = неделя 4, 8 или 10 лечения.

На фиг. 16F показано процентное содержание (%) пролиферирующих реактивных в отношении вируса Т-клеток в МКПК пациента, которого лечили ДарзалексомTM (даратумумабом), с ПР на базовом уровне и в указанные моменты времени на протяжении лечения. Белый столбец: отрицательный контроль; черный столбец: с добавлением ЦЭГ. Звездочка указывает на статистически значимое изменение. Пре 4, 8, 10 = неделя 4, 8 или 10 лечения.

На фиг. 17А приведена гистограмма анализа FACS, иллюстрирующая уровни экспрессии CD38 в естественных клетках-киллерах (NK), моноцитах, В-клетках и Т-клетках от здорового донора.

На фиг. 17В приведена гистограмма анализа FACS, иллюстрирующая уровни экспрессии CD38 в плазматических клетках, естественных клетках-киллерах (NK), моноцитах, В-клетках и Т-клетках от пациентки с множественной миеломой.

На фиг. 17С показано сравнение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD38 в CD38⁺ T_{reg}, V_{reg}, NK, В-клетках и Т-клетках от пациентов с рецидивной и рефрактерной множественной миеломой. CD38 экспрессировался на более низком уровне в В-клетках и Т-клетках по сравнению с CD38⁺ T_{reg}, V_{reg} и NK-клетками.

На фиг. 18 показано, что белок PD-L1 характеризуется понижающей регуляцией в образцах МКПК от пациентов с ответом (О) и повышающей регуляцией у пациентов без ответа (БО) с течением времени. СЗ: стабильное заболевание. C1D1: цикл 1, день 1; C3D1: цикл 3, день 1. По оси Y показан log2 значений концентрации белка.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании и в прилагаемых пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают и множественные обозначения, если только содержание текста не определяет иного. Так, например, обозначение "клетка" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

Термин "CD38" относится к белку CD38 человека (синонимы: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФ-гидролаза 1, циклическая АДФ-рибозогидролаза 1). CD38 человека имеет аминокислотную последовательность, которая показана в GenBank в порядке поступления NP_001766 и в SEQ ID NO: 1. Хорошо известно, что CD38 представляет собой однопроходный мембранный белок типа II с аминокислотными остатками 1-21, представляющими цитозольный домен, аминокислотными остатками 22-42, представляющими трансмембранный домен, и остатками 43-300, представляющими внеклеточный домен CD38.

SEQ ID NO: 1

MANCEFSFVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPWRQWQSGPGTTKRFP
PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTPVCNKIL
LWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSV
FWKTVSRRFAEAAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLQAWVINGGREDSDR
DLCQDPTIKELESIIISKRNIFQSCKNIRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

В контексте данного документа термин "антитела" подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулина, в том числе моноклональные антитела, включая мышиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий участок требуемой специфичности.

Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG, в свою очередь, подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "фрагменты антитела" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий участок тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарности области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, вариабельная область тяжелой цепи (VH) или вариабельная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, HV, CL и CH1; фрагмент F(ab)₂ - бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмент доменного антитела (dAb) (Ward et al., Nature? 341:544-6, 1989), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкциями антител, с образованием моновалентного антигенсвязывающего участка, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

Термин "выделенное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, по существу не содержащие других антител, имеющих отличную антигенную специфичность (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, по существу не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от CD38 человека). Однако выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как ортологи человеческого CD38, например CD38 *Macaca fascicularis* (яванского макака). В случае биспецифического антитела биспецифическое антитело специфически связывается с двумя представляющими интерес антигенами и по существу не содержит антител, специфически связывающихся антигены, отличные от двух представляющих интерес антигенов. Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ. Термин "выделенное антитело" включает антитела, выделенные так, чтобы иметь более высокую степень чистоты, такие как антитела, являющиеся чистыми на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Термины "специфическое связывание" или "специфически связывает", или "связывает" относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей около 1×10^{-8} М или менее, например, около

1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, с KD, которая по меньшей мере в сто раз меньше KD связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно определить стандартными способами. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например в отношении такого же антигена от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca fascicularis* (яванский макак), *Pan troglodytes* (шимпанзе) или *Callithrix jacchus* (обычная мармозетка, мармозетка). Тогда как моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Вариабельная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязывающими участками". Антигенсвязывающие участки определяют с помощью различных терминов: определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), учитывают вариабельность последовательности (Wu and Kabat (1970), J. Exp. Med. 132:211-50; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). Термин "гипервариабельные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относится к областям вариабельных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk (1987), Mol. Biol. 196:901-17). Другие термины включают "IMGT-CDR" (Lefranc et al., (2003), Dev. Comparat Immunol. 27:55-77) и "использование остатков, определяющих специфичность" (SDRU) (Almagro (2004), Mol. Recognit. 17:132-43). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих участков. Соответствие между определениями CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., (2003), Dev. Comparat Immunol. 27:55-77.

В контексте данного документа термин "остатки по Chothia" означает остатки VL и VH антител с нумерацией по Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273:927-48).

Термины "каркасная область" или "каркасные последовательности" представляют собой оставшиеся последовательности вариабельной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие участки. Так как антигенсвязывающие участки, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркасной области зависит от определения антигенсвязывающего участка.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором антигенсвязывающие участки получены из видов, отличных от человека, а каркасные области вариабельной области получены из последовательностей иммуноглобулинов человека.

Гуманизированные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасная область может не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или генов последовательностей зародышевой линии.

Термин "человеческое антитело" относится к антителу, имеющему вариабельные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные области, так и антигенсвязывающие участки получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепей, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, причем вариабельные области антитела получены из системы, в которой используются гены иммуноглобулина зародышевой линии или перестроенные гены иммуноглобулина человека. Такие системы включают библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, таких как мыши, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. "Человеческое антитело" может содержать аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулином зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасную или антигенсвязывающую область, или в обе. Как правило, "человеческое антитело" по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализа каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000), J. Mol. Biol. 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010), J. Mol. Biol. 397:385-96 и международной патентной публикации № WO 2009/085462.

Человеческие антитела, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включающий синтетические CDR и/или синтетические каркасные области, или могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу для улучшения

свойств антител, что приводит к получению антител, в естественных условиях не входящих в репертуар человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Антитела, в которых антигенсвязывающие участки получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

Термин "рекомбинантное антитело" включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из организма животного, например мыши или крысы, являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или полученные из них гибридомы (дополнительно описанные ниже), антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* путем обмена плеч Fab, такие как биспецифические антитела.

Термин "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклональных антител демонстрирует одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам. Следовательно, "моноклональным антителом" называется популяция антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина в тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование в пределах популяции антител. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим или одновалентным, бивалентным или мультивалентным.

Биспецифическое антитело включено в термин "моноклональное антитело".

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которой специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных групп компонентов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные зарядовые характеристики. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационную пространственную единицу. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена находятся в непосредственной близости друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от контрольного полипептида или контрольного полинуклеотида одной или более модификациями, например, заменами, вставками или делециями.

Выражение "в комбинации с" означает, что два или более терапевтических средства вместе вводят субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке. В общем случае каждый агент вводят в дозе и/или согласно временному режиму, определенному для этого агента.

Термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, при котором целью является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, такого как развитие или распространение опухоли или опухолевых клеток, или же достижение благоприятного или желаемого клинического результата в ходе лечения. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, отсутствие метастазов, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. К нуждающимся в лечении относятся субъекты, у которых уже имеются нежелательные физиологические изменения или заболевание, а также субъекты, склонные к физиологическим изменениям или заболеванию.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшение самочувствия пациента, снижение в опухолевой нагрузки, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Выражение "ингибирует рост" (например, в отношении опухолевых клеток) относится к определяемому снижению или замедлению роста опухолевых клеток или опухолевой ткани *in vitro* или *in vivo* при приведении их в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических или лекарственных средств по сравнению со снижением или замедлением роста таких же опухолевых клеток

или опухолевой ткани в отсутствие терапевтического средства или комбинации терапевтических лекарственных средств. Ингибирование роста опухолевой клетки или опухолевой ткани *in vitro* или *in vivo* может составлять по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

"Регуляторные Т-клетки" или "T_{reg}" относятся к Т-лимфоцитам, которые регулируют активность других Т-клеток и/или других иммунных клеток, обычно подавляя их активность. T_{reg} могут представлять собой Т-клетки CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Следует принимать во внимание, что T_{reg} могут быть не полностью ограничены этим фенотипом и могут экспрессировать Foxp3.

"Эффекторные Т-клетки" или "T_{eff}" относятся к Т-лимфоцитам, которые выполняют функцию иммунного ответа, такого как уничтожение опухолевых клеток и/или активация противоопухолевого иммунного ответа, который может приводить к выведению опухолевых клеток из организма. T_{eff} могут представлять собой CD3⁺ с CD4⁺ или CD8⁺. T_{eff} могут секретировать, содержать или экспрессировать маркеры, такие как IFN-γ, гранзим В и ICOS. Следует принимать во внимание, что T_{eff} могут быть не полностью ограничены этим фенотипом.

"Функция T_{reg}" или "T_{reg}-функция" относится к супрессивной функции T_{reg}, которая касается регуляции иммунных ответов организма-хозяина и/или предотвращения аутоиммунитета. Функцией T_{reg} может являться подавление противоопухолевого ответа, вызываемого Т-клетками CD8⁺, естественными клетками-киллерами (NK), МΦ-клетками, В-клетками или дендритными клетками (ДК), или подавление пролиферации эффекторных Т-клеток.

Выражение "ингибирует функцию T_{reg}" или "ингибирует T_{reg}-функцию" относится к снижению уровня функции T_{reg} *in vitro* или *in vivo* в организме животного или человека, что можно определить традиционными методами, известными в данной области. Уровень функции T_{reg} может быть снижен, например, по меньшей мере на около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%. Выражение "ингибирует функцию T_{reg}" включает снижение числа T_{reg}, например, вследствие уничтожения T_{reg} посредством эффекторных функций антител, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ).

"Миелоидные супрессорные клетки" или "МСК" относятся к специализированной популяции клеток гемопоэтической линии дифференцировки, которые экспрессируют макрофагальный/моноцитарный маркер CD11b и гранулоцитарный маркер Gr-1/Ly-6G. Фенотип МСК может представлять собой, например, CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺. МСК характеризуются низкой или невыявляемой экспрессией маркеров зрелых антигенпрезентирующих клеток ГКГС класса II и F480. МСК представляют собой незрелые клетки миелоидной линии дифференцировки и могут дополнительно дифференцироваться в несколько типов клеток, включая макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, моноциты или гранулоциты. МСК могут естественным образом обнаруживаться в нормальном взрослом костном мозге человека и животных или в местах нормального гемопоэза, таких как селезенка.

Выражение "ингибирует функцию МСК" или "ингибирует T_{reg}-МСК" относится к снижению уровня функции МСК *in vitro* или *in vivo* в организме животного или человека, что можно определить традиционными методами, известными в данной области. Уровень функции МСК может быть снижен, например, по меньшей мере на около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%. Выражение "ингибирует функцию МСК" включает снижение числа МСК, например, вследствие уничтожения МСК посредством эффекторных функций антител, таких как АЗКЦ. МСК могут подавлять Т-клеточные ответы, такие как пролиферация, клональное размножение или выработка цитокинов, посредством различных механизмов, таких как выработки реактивных кислородных молекул, пероксинитритов, повышенный метаболизм аргиназы вследствие высоких уровней аргиназы и повышенное количество синтазы оксида азота. МСК могут демонстрировать ответ на IFN-γ и несколько цитокинов, таких как IL-4 и IL-13. IFN-γ может активировать МСК, что индуцирует активность синтазы оксида азота 2 (NOS2). В альтернативном варианте цитокины Th2, такие как интерлейкин-4 (IL-4) и IL-13, могут активировать МСК, что может приводить к индукции активности аргиназы-1 (ARG1). Метаболизм L-аргинина, осуществляемый NOS2 или ARG1, может приводить к ингибированию пролиферации Т-клеток, а активность обоих ферментов вместе может приводить к апоптозу Т-клеток посредством выработки реактивных молекул оксида азота.

"Связанное с T_{reg} заболевание" относится к заболеванию или нарушению, связанному с регуляторными Т-клетками (T_{reg}). Связанное с T_{reg} заболевание может быть вызвано функцией T_{reg}, например подавлением противоопухолевого ответа или подавлением пролиферации эффекторных Т-клеток. Опосредованное T_{reg} заболевание может представлять собой рак. Выражения "связанное с T_{reg} заболевание" и "опосредованное T_{reg} заболевание" взаимозаменяемо употребляются в данном документе.

Выражения "повышать ответ эффекторных Т-клеток" или "повышать ответы Т-клеток" относятся к повышению или стимуляции эффекторных Т-клеток *in vitro* или *in vivo* в организме животного или человека для того, чтобы они имели продолжительную или усиленную биологическую функцию, или к обновлению или реактивации истощенных или неактивных Т-клеток. Типовыми Т-клеточными ответами являются пролиферация, секреция γ-интерферона из Т-клеток CD8⁺, восприимчивость к антигенам или клональное размножение. Способ определения этого повышения известен специалисту в данной области.

"Связанное с МСК заболевание" относится к заболеванию или нарушению, связанному с миелоидными супрессорными клетками (МСК). Связанное с МСК заболевание может быть вызвано функцией

МСК, например подавлением противоопухолевого ответа или пролиферации эффекторных Т-клеток. Опосредованное МСК заболевание может представлять собой рак. Выражения "связанное с МСК заболевание" и "опосредованное МСК заболевание" взаимозаменяемо употребляются в данном документе.

"Регуляторные В-клетки" или "V_{reg}" относятся к В-лимфоцитам, которые подавляют иммунные ответы. V_{reg} могут представлять собой клетки CD19⁺CD24⁺CD38⁺ и могут подавлять иммунные ответы путем ингибирования пролиферации Т-клеток, опосредованной IL-10, секретируемым V_{reg}. Следует принимать во внимание, что существуют другие подгруппы V_{reg}, которые описаны, например, в Ding et al., (2015), *Human Immunology*, 76:615-621.

"Связанное с V_{reg} заболевание" относится к заболеванию или нарушению, связанному с регуляторными В-клетками. Связанное с V_{reg} заболевание может быть вызвано, например, опосредованным V_{reg} подавлением противоопухолевого ответа или пролиферации эффекторных Т-клеток. Опосредованное V_{reg} заболевание может представлять собой рак. Выражения "связанное с V_{reg} заболевание" и "опосредованное V_{reg} заболевание" взаимозаменяемо употребляются в данном документе.

Термин "пациент" включает в себя любых людей или животных. Термин "животное" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д. Термины "пациент" и "субъект" взаимозаменяемо употребляются в данном документе.

В изобретении предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, антителом, которое специфически связывает CD38, вне зависимости от того, экспрессируют опухолевые клетки CD38 или нет. В изобретении дополнительно предложены способы лечения пациента, имеющего опосредованное регуляторными Т-клетками (T_{reg}), миелоидными супрессорными клетками (МСК) или регуляторными В-клетками (V_{reg}) заболевание. В изобретении дополнительно предложены способы модуляции активности T_{reg}, МСК или V_{reg} для лечения солидных опухолей, являющихся CD38-положительными и/или связанных с высокими уровнями этих иммунных супрессивных клеток.

Изобретение основывается, по меньшей мере частично, на открытии того, что анти-CD38 антитело Дарзалекс™ (даратумумаб) обладает иммуномодулирующей активностью в организме пациентов, снижает число иммунных супрессивных T_{reg}, МСК и V_{reg}, повышает число Т-клеток CD8⁺ и соотношение между CD8⁺ и T_{reg}, стимулирует образование центральных клеток памяти CD8⁺ и повышает клональность Т-клеток.

На данный момент Дарзалекс™ (даратумумаб) и другие анти-CD38 антитела проходят клиническую оценку их эффективности в отношении лечения гемовых злокачественных образований и связанных с плазматическими клетками нарушений, включая множественную миелому, вследствие способности антитела уничтожать CD38-положительные клетки посредством эффекторных функций антитела, таких как АЗКЦ, КЗЦ, АЗКФ и апоптоз, но их иммуномодулирующая активность в отношении стимуляции адаптивных иммунных ответов не была обнаружена. Другие иммуномодулирующие антитела (анти-PD1, анти-CTLA4) функционируют посредством нацеливания на компоненты иммунной системы, которые подавляют противоопухолевые ответы. Например, было продемонстрировано, что анти-PD1 антитела повышают пролиферацию Т-клеток, стимулируют антигенспецифические вторичные иммунные ответы и частично снижают опосредованную T_{reg} супрессию эффекторных Т-клеток *in vitro* (например, см. патент США № 8779105). На данный момент два анти-PD-1 антитела одобрены для лечения меланомы, Опдиво® (ниволумаб) и Кейтруда® (пембролизумаб) и находятся на стадии клинической разработки для лечения различных солидных опухолей, таких как немелкоклеточная карцинома легкого, рак простаты, головы и шеи, желудочно-кишечного тракта, желудка, простаты, фаллопиевой трубы, яичника, поджелудочной железы, молочной железы и головного мозга, почки, мочевого пузыря, уретры, пищевода и колоректальный рак. Анти-CTLA-4 антитело Ервой® (ипилимумаб) было одобрено для лечения меланомы. Ервой® (ипилимумаб) и другое анти-CTLA-4 антитело, тремелимуаб, также находятся в разработке для лечения рака простаты, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, желудочно-кишечного тракта, желудка, колоректального рака, рака почки, пищевода и уrogenитального рака.

Без стремления к ограничению какой-либо конкретной теорией, учитывая иммуномодулирующее действие, наблюдаемое при применении описанного в данном документе Дарзалекса™ (даратумумаба), Дарзалекс™ (даратумумаб) и другие анти-CD38 антитела могут оказаться эффективными в лечении солидных опухолей. Вследствие общей активации иммунного ответа, наблюдаемой у пациентов, которых лечили Дарзалексом™ (даратумумабом), пациенты, имеющие CD38-отрицательные солидные опухоли, также могут демонстрировать ответ на терапию анти-CD38.

В изобретении предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное регуляторными Т-клетками (T_{reg}) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для лечения опосредованного T_{reg} заболевания.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное миелоидными супрессорными клетками (МСК) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для лечения опосредованного МСК заболевания.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего опосредованное регуляторными В-клетками (B_{reg}) заболевание, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для лечения опосредованного B_{reg} заболевания.

В изобретении также предложен способ подавления активности регуляторных Т-клеток (T_{reg}), включающий приведение регуляторных Т-клеток в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности миелоидных супрессорных клеток (МСК), включающий приведение МСК в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ подавления активности регуляторных В-клеток (B_{reg}), включающий приведение B_{reg} в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий снижение числа регуляторных Т-клеток (T_{reg}) у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий снижение числа миелоидных супрессорных клеток (МСК) у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий снижение числа регуляторных В-клеток (B_{reg}) у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

В изобретении также предложен способ повышения иммунного ответа у пациента, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для повышения иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет вирусную инфекцию.

В изобретении также предложен способ лечения вирусной инфекции у пациента, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела, которое специфически связывает CD38, в течение времени, достаточного для лечения вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой ответ эффекторных Т-клеток (T_{eff}).

В некоторых вариантах осуществления ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD4^+$ или Т-клетками $CD8^+$.

В некоторых вариантах осуществления ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD4^+$.

В некоторых вариантах осуществления ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD8^+$.

В некоторых вариантах осуществления ответ T_{eff} состоит в повышении числа Т-клеток $CD8^+$, повышении пролиферации Т-клеток $CD8^+$, повышении клонального размножения Т-клеток, повышении образования клеток памяти $CD8^+$, повышении антигензависимой выработки антител или повышении выработки цитокинов, хемокинов или интерлейкинов.

Пролиферацию Т-клеток можно оценить, например, путем определения скорости синтеза ДНК с применением тритированного тимидина, или определения выработки интерферона- γ (IFN- γ) *in vitro*, или определения абсолютного числа или процентного содержания Т-клеток в популяции клеток из образцов пациента с применением известных способов.

Клональное размножение можно оценить, например, путем секвенирования РТК из пула Т-клеток с применением известных способов.

Образование клеток памяти можно оценить, например, путем определения соотношения между наивными Т-клетками ($CD45RO^-/CD62L^+$) и Т-клетками памяти ($CD45RO^+/CD62L^{high}$), используя, например, FACS.

Выработку цитокинов, хемокинов или интерлейкинов, такую как выработка интерферона- γ (IFN- γ), фактора некроза опухолей-альфа (TNF- α), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 и IL-23, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL4, можно оценить, используя стандартные способы, такие как анализ ELISA или ELLISPOT.

Выработку антигенспецифических антител можно оценить в образцах, полученных от пациента, используя стандартные способы, такие как анализ ELISA или радиоиммуноанализ (РИА).

Значение "повышать" или "повышение" различных ответов T_{eff} понять нетрудно. Повышение может составлять по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10, 25, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400% или более в исследуемом образце или у субъекта по сравнению с контролем, например у пациента, которого лечили

анти-CD38 антителом, по сравнению с тем же пациентом до лечения, или у пациента или группы пациентов, восприимчивых к лечению анти-CD38 антителом, по сравнению с пациентом или группой пациентов, невосприимчивых к тому же лечению. Как правило, повышение является статистически значимым.

Аналогично, значение "снижать" или "снижение" или "уменьшать" или "уменьшение" числа T_{reg} , МСК и/или B_{reg} понять нетрудно. Снижение может составлять по меньшей мере около 10, 25, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400% или более в исследуемом образце или у субъекта по сравнению с контролем, например, у пациента, которого лечили анти-CD38 антителом, по сравнению с тем же пациентом до лечения, или у пациента или группы пациентов, восприимчивых к лечению анти-CD38 антителом, по сравнению с пациентом или группой пациентов, невосприимчивых к тому же лечению. Как правило, снижение является статистически значимым.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, ингибирует функцию иммунных супрессорных клеток.

В некоторых вариантах осуществления иммунными супрессорными клетками являются регуляторные Т-клетки (T_{reg}), миелоидные супрессорные клетки (МСК) или регуляторные В-клетки (B_{reg}).

В некоторых вариантах осуществления T_{reg} представляют собой Т-клетки $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$.

В некоторых вариантах осуществления клетки $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ экспрессируют Foxp3.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ экспрессируют CD38.

Функцию T_{reg} , такую как их способность супрессировать клетки T_{eff} , можно оценить известными способами, такими как оценка способности T_{reg} подавлять пролиферацию T_{eff} в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛР).

Функцию T_{reg} можно ингибировать, например, путем снижения относительного количества T_{reg} по сравнению с T_{eff} (например, повышения соотношения клеток $CD8^+/T_{reg}$) посредством прямого уничтожения T_{reg} или субпопуляции T_{reg} , такой как $CD38^+ T_{reg}$.

В некоторых вариантах осуществления функция T_{reg} ингибируется посредством уничтожения клеток T_{reg} .

В некоторых вариантах осуществления уничтожение T_{reg} опосредовано индуцированной антителом антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ), комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или апоптозом, индуцированным антителом, специфически связывающим CD38.

В некоторых вариантах осуществления уничтожение T_{reg} опосредовано АЗКЦ.

В некоторых вариантах осуществления происходит уничтожение $CD38^+ T_{reg}$.

В некоторых вариантах осуществления происходит уничтожение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 60% клеток T_{reg} .

Так как CD38 экспрессируется только в части T_{reg} и МСК, ожидается, что лечение пациентов с солидными опухолями не приведет к системному истощению T_{reg} и МСК, следовательно, это вероятно приведет к улучшению профиля безопасности.

В некоторых вариантах осуществления МСК представляют собой клетки $CD11b^+HLA^+DR^+CD14^+CD33^+CD15^+$.

В некоторых вариантах осуществления МСК $CD11b^+HLA^+DR^+CD14^+CD33^+CD15^+$ экспрессируют CD38.

Функцию МСК можно ингибировать, например, путем снижения числа МСК посредством прямого уничтожения клеток.

В некоторых вариантах осуществления функция МСК ингибируется путем уничтожения $CD38^+$ МСК.

В некоторых вариантах осуществления уничтожение МСК опосредовано индуцированной антителом антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ), комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или апоптозом, индуцированным антителом, специфически связывающим CD38.

В некоторых вариантах осуществления уничтожение МСК опосредовано АЗКЦ.

В некоторых вариантах осуществления происходит уничтожение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 60% клеток МСК.

В некоторых вариантах осуществления B_{reg} представляют собой клетки $CD19^+CD24^+CD38^+$.

Функцию B_{reg} можно ингибировать, например, путем снижения числа B_{reg} посредством прямого уничтожения B_{reg} .

В некоторых вариантах осуществления функция B_{reg} ингибируется уничтожением $CD38^+ B_{reg}$.

В некоторых вариантах осуществления уничтожение B_{reg} опосредовано индуцированной антителом антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), антителозависимым клеточным фагоцитозом

(АЗКФ), комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или апоптозом, индуцированным антителом, специфически связывающим CD38.

В некоторых вариантах осуществления уничтожение V_{reg} опосредовано АЗКЦ.

В некоторых вариантах осуществления происходит уничтожение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 60% клеток V_{reg} .

T_{reg} играет важную роль в поддержании периферической аутоотолерантности. $CD4^+CD25^{high} T_{reg}$ природного происхождения вырабатываются в тимусе и экспрессируют Foxp3, транскрипционный фактор, необходимый для установления и поддержания идентичности линии дифференцировки и супрессорной функции T_{reg} . T_{reg} могут накапливаться на участке заболевания (например, в опухоли), где они подавляют эффекторную функцию специфических в отношении опухолевых антигенов Т-клеток, что приводит к недостаточным противоопухолевым ответам. Повышенная плотность инфильтрирующих опухоль Foxp3⁺ T_{reg} связана с неблагоприятным прогнозом в случае различных солидных опухолей, включая карциному поджелудочной железы, яичника и гепатоцеллюлярную карциному. Истощение T_{reg} приводит к повышенной противоопухолевой иммунности и отторжению опухолей в мышинных моделях, но также может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний.

Миелоидные супрессорные клетки (МСК) являются гетерогенной популяцией ранних миелоидных предшественников, незрелых гранулоцитов, макрофагов и дендритных клеток на разных стадиях дифференцировки. Они накапливаются в больших количествах у раковых пациентов и обладают сильными иммуносупрессивными функциями, подавляя как цитотоксическую активность естественных клеток-киллеров (NK) и естественных Т-клеток-киллеров (NKT), так и адаптивный иммунный ответ, опосредованный Т-клетками CD8⁺. Хотя механизм ингибирования NK-клеток на данный момент не полностью понятен, за опосредованную МСК супрессию Т-клеток отвечают многие пути, включая выработку аргиназы 1/ARG1 и повышающую регуляцию синтазы оксида азота 2 (NOS2). ARG1 и NOS2 метаболизируют L-аргинин и вместе или раздельно блокируют трансляцию CD3зета-цепи Т-клеток, ингибируют пролиферацию Т-клеток и стимулируют апоптоз Т-клеток. Кроме того, МСК секретируют иммуносупрессивные цитокины и индуцируют развитие регуляторных Т-клеток.

МСК индуцируются провоспалительными цитокинами и обнаруживаются в повышенных количествах при инфекционных и воспалительных патологических состояниях. Они накапливаются в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных органах несущих опухоли мышей, а их присутствие в опухолевом микроокружении предположительно играет причинную роль в стимуляции опухолеассоциированной иммунной супрессии.

МСК были описаны у пациентов с карциномой толстой кишки, меланомой, гепатоцеллюлярной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, немелкоклеточной карциномой легкого, почечно-клеточной карциномой, аденокарциномой поджелудочной железы и карциномой молочной железы (Mandrizzato et al., (2009), J. Immunol. 182:6562-6568; Liu et al., (2009), J. Cancer Res. Clin. Oncol. 136:35-45; Ko et al., (2009), Clin. Cancer Res. 15:2148-2157; Morse et al., (2009), Expert. Opin. Ther. 9:331-339; Diaz-Montero et al., (2009), Cancer Immunol. Immunother. 58:49-59; Corzo et al., (2009), J. Immunol. 182:5693-5701). В случае раковых пациентов Diaz et al. (Diaz-Montero et al., (2009), Cancer Immunol. Immunother. 58:49-59) предположили, что накопление МСК коррелирует с более поздней стадией заболевания и неблагоприятным прогнозом.

Инфильтрирующие опухоль V_{reg} были выявлены в солидных опухолях и также V_{reg} могут стимулировать рост и метастазирование опухоли посредством различных механизмов, таких как подавление противоопухолевой активности Т-клеток CD8⁺ и NK-клеток, как описано, например, в Ding et al., (2015), Human Immunology, 76:615-62.

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "АЗКЦ" представляют собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными клетками-киллерами, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Гибель покрытых антителами клеток-мишеней, таких как CD38-экспрессирующие клетки, происходит в результате активности эффекторных клеток через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки АЗКЦ-активности антитела, которое специфически связывает CD38, это антитело можно добавлять к CD38-экспрессирующим клеткам в комбинации с иммунными эффекторными клетками, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз по существу обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или естественных внутриклеточных белков). Примеры эффекторных клеток для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и NK-клетки. Типовые клетки-мишени включают T_{reg} или МСК, экспрессирующие CD38. В примере анализа клетки-мишени метят 20 мКи ⁵¹Cr в течение 2 ч и тщательно про-

мывают. Концентрацию клеток-мишеней могут корректировать до 1×10^6 клеток/мл и добавляют антитела к CD38 в различных концентрациях. Проведение анализа начинают с добавления клеток-мишеней в соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени 40:1. После инкубации в течение 3 ч при 37°C проведение анализа прекращают путем центрифугирования и измеряют на сцинтилляционном счетчике высвобождение ^{51}Cr из лизированных клеток. Процентное значение клеточной цитотоксичности можно рассчитывать как % максимального лизиса, который можно индуцировать путем добавления к клеткам-мишеням 3% хлорной кислоты.

"Антителозависимый клеточный фагоцитоз" (АЗКФ) относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. АЗКФ можно оценить, используя T_{reg} или МСК, экспрессирующие CD38, в качестве клеток-мишеней, сконструированных, чтобы экспрессировать ЗФБ или другую меченую молекулу. Соотношение эффекторные клетки:клетки-мишени может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 ч, с антителом к CD38 или без него. После инкубации клетки можно отделить с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процент фагоцитоза можно определить на основании % флуоресцентного ЗФБ в макрофагах $CD11^+CD14^+$ с помощью стандартных методов.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность", или "КЗЦ", относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен F_c связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента $C1q$, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует проявлению АЗКЦ посредством связывания на лейкоцитах с рецепторами комплемента (например, CR3).

Способность моноклональных антител индуцировать АЗКЦ можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека подвергаются N-гликозилированию в Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах около по меньшей мере 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям F_c , усиливает АЗКЦ антител посредством улучшенного связывания $Fc\gamma RIIIa$ без изменения связывания с антигеном или КЗЦ-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих F_c -олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., (2012), *Cytotechnology*, 64:249-65), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., (2002), *J. Biol. Chem.* 277:2 6733-26740), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO EB66 (Olivier et al., (2010), *MAbs* 2(4), предварительная электронная публикация; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., (2003), *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., (2004), *Biotechnol. Bioeng.* 88:901-908), или коэкспрессия β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунезина (Ferrara et al., (2006), *J. Biol. Chem.* 281:5032-5036; Ferrara et al., (2006), *Biotechnol. Bioeng.* 93:851-861; Xhou et al., (2008), *Biotechnol. Bioeng.* 99:652-65). АЗКЦ, вызываемая антителами к CD38, которые применяются в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, может также усиливаться за счет некоторых замен в F_c антитела. Примерами замен являются, например, замены в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует индексу ЕС), как описано в патенте США № 6737056.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит замену в F_c антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит замену в F_c антитела в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 и/или 430 (нумерация остатков соответствует индексу ЕС).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы от около 0 до около 15%, например, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы около 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%.

Замены в F_c и сниженное содержание фукозы могут усиливать активность АЗКЦ антитела к CD38.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной

цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут быть охарактеризованы и количественно измерены посредством множества способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной публикации № WO 2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением посредством ВЭЖХ (СВЭЖХ) с обнаружением с помощью флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой гликанов Asn297 или без нее с помощью Endo S или другого фермента, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, сохраняя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщеплением mAb на составляющие пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); или 5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb на Asn 297 посредством специфического ферментативного дегликозилирования с помощью PNGase F. Высвобожденные олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют: точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сialiлирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Выражения "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы", используемые в данном документе, относятся к антителам с содержанием фукозы около 0-15%.

Выражение "нормофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы", используемые в данном документе, относятся к антителам с содержанием фукозы более чем около 50%, как правило, более чем около 60, 70, 80 или более 85%.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, может индуцировать уничтожение T_{reg} , МСК и/или B_{reg} посредством апоптоза. Способы оценки апоптоза хорошо известны и включают, например, окрашивание аннексином IV с помощью стандартных способов. Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать апоптоз на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% клеток.

В некоторых вариантах осуществления T_{eff} или иммунные супрессорные клетки находятся в костном мозге или в периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления T_{eff} или иммунные супрессорные клетки находятся в костном мозге.

В некоторых вариантах осуществления T_{eff} или иммунные супрессорные клетки находятся в периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, повышает соотношение между Т-клетками $CD8^+$ и T_{reg} .

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, повышает соотношение между центральными клетками памяти $CD8^+$ и наивными клетками $CD8^+$. Центральные клетки памяти $CD8^+$ могут быть определены как клетки $CD45RO^+/CD62L^{+high}$. Наивные клетки $CD8^+$ могут быть определены как клетки $CD45RO^+/CD62L^+$.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, является неагонистическим антителом.

Неагонистическое антитело, которое специфически связывает CD38, относится к антителу, которое после связывания с CD38 не индуцирует значительную пролиферацию образца моноклеарных клеток периферической крови *in vitro* по сравнению с пролиферацией, индуцируемой изотипическим контрольным антителом или одной средой.

В некоторых вариантах осуществления неагонистическое антитело, которое специфически связывает CD38, индуцирует пролиферацию моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) статистически незначимым образом. Пролиферацию МКПК можно оценить путем выделения МКПК от здоровых доноров и культивирования клеток при 1×10^5 клеток/лунку в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии или отсутствии исследуемого антитела в 200 мкл RPMI. Через четыре дня инкубации при 37°C можно добавить 30 мкл 3Н-тимидина (16,7 мКи/мл) и продолжить культивирование в течение ночи. Включение 3Н-тимидина можно оценить с помощью гамма-счетчика Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, CT, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Данные могут быть расчитаны как среднее число отсчетов в минуту (+СПС) для МКПК, полученных от нескольких доноров. Статистическую значимость или незначимость между образцами, культивируемыми в присутствии или

отсутствие исследуемого антитела, рассчитывают стандартными способами.

Примером анти-CD38 антитела, которое применимо в способах изобретения, является Дарзалекс™ (даратумумаб). Дарзалекс™ (даратумумаб) содержит аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которые показаны в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, определяющих комплементарность областей тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и определяющих комплементарность областей легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, имеет подтип IgG1/κ и описан в патенте США № 7829693. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи Дарзалекса™ (даратумумаба) показана в SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, связывается, по меньшей мере, с областью SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) и областью EK-VQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO: 1

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQWSGPGTTKRF
PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKIL
LWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLADDLTWCGEFNSTKINYQSCPDWRKDCSNNPVSV
FWKTVSRRFAEAACDVVHMLNGSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSR
DLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLEAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILWFGEVFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILWFGEVFDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Антитела можно оценивать в отношении их конкуренции с эталонным антителом, таким как Дарзалекс™ (даратумумаб), имеющим VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для связывания с CD38 с применением хорошо известных способов *in vitro*. В типовом способе клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие CD38, можно инкубировать с немеченым эталонным антителом в течение 15 мин при 4°C с последующей инкубацией с избытком флуоресцентно меченного исследуемого антитела в течение 45 мин при 4°C. После промывания в ФСБ/БСА можно проводить измерение флуоресценции методом проточной цитометрии с помощью стандартных способов. В другом примере способа внеклеточный участок человеческого CD38 может быть нанесен на поверхность планшета для ELISA. В течение около 15 мин можно добавлять избыток немеченого эталонного антитела, а впоследствии можно добавлять биотинилированные исследуемые антитела. После промывок в ФСБ/Твин связывание исследуемого биотинилированного антитела можно определять с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и регистрировать сигнал с помощью стандартных способов. Очевидно, что в конкурентных анализах эталонное антитело может быть меченым, а исследуемое антитело - немеченым. Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если эталонное антитело ингибирует связывание исследуемого антитела, или исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с CD38 по меньшей мере на 80%, например, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Можно дополнительно определить эпитоп исследуемого антитела, например, путем пептидного картирования или посредством анализов с защитой водорода/дейтерия с помощью известных способов, или же посредством определения структуры кристалла.

Антитела, связывающиеся с областью SKRNIQFSCKNIIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EK-VQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в

SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов и описанных в данном документе способов и определения характеристик полученных антител в отношении связывания с пептидами, например используя анализ ELISA или исследование мутагенеза.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту анти-CD38 антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). Эпитоп антитела, применяемого в способах согласно изобретению, содержит некоторые или все из остатков, имеющих последовательности, показанные в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере одну аминокислоту в области SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одну аминокислоту в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере две аминокислоты в области SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере две аминокислоты в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере три аминокислоты в области SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере три аминокислоты в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит VH, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 4, и VL, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

Другими типовыми анти-CD38 антителами, которые применимы в способах изобретения, являются: mAb003, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США № 7829693. VH и VL mAb003 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIAN
SAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDVAVYYCARDIAALGPFDFYWGQGLTVTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAHYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQYNSYPRTFGQGTKVEIK;

mAb024, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, описанное в патенте США № 7829693. VH и VL mAb024 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPHDSAR
YSPFQGVTFSDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVTVSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTITSLLEP
EDFAVYYCQQRNWPPTFGQGTKVEIK;

MOR-202 (MOR-03087), содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно, описанное в патенте США № 8088896. VH и VL MOR-202 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 18

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSTNY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCARDLPLVYTGFAWYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQQKPGQAPVLIYGDSCRPSGIPE

RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ;

Изатуксимаб, содержащий последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно, описанный в патенте США № 8153765. VH и VL изатуксимаба могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.
SEQ ID NO 20:

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTG

YAQKFQGKATLTADKSSKTVMHLSSLASEDSAVYYCARGDYGSNSLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 21:

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVP

DRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIK

Другие примеры антител к CD38, которые можно применять в способах изобретения, включают в себя антитела, описанные в международной патентной публикации № WO 05/103083, международной патентной публикации № WO 06/125640, международной патентной публикации № WO 07/042309, международной патентной публикации № WO 08/047242 или международной патентной публикации № WO 14/178820.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15 в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17 в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19 в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21 в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой меланому.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ).

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой неплоскоклеточный НМКРЛ.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой аденокарциному легкого.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой почечно-клеточную карциному (ПКК) (например, светлоклеточную почечную карциному или папиллярную почечную карциному) или ее метастатическое поражение.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой мезотелиому.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой носоглоточную карциному (НГК).

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак простаты или кастрационно-резистентный рак простаты.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак печени.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак щитовидной же-

лезы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой карциномы пищевода и желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак фаллопиевой трубы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак уретры.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой урогенитальный рак.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой эндометриоз.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак шейки матки.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой метастатическое поражение рака.

В некоторых вариантах осуществления в солидной опухоли отсутствует экспрессия CD38.

В солидной опухоли отсутствует выявляемая экспрессия CD38, когда экспрессия CD38 в солидной опухолевой ткани или в клетках, выделенных из солидной опухоли, является статистически незначимой по сравнению с контролем, например, экспрессия, выявляемая для анти-CD38 антитела, по сравнению с экспрессией, выявляемой для изотипического контрольного антитела, с применением хорошо известных способов.

Анти-CD38 антитела, применяемые в способах согласно изобретению, могут также быть выбраны *de novo*, например, из библиотеки фагового дисплея, где фаг конструируется таким образом, чтобы экспрессировать иммуноглобулины человека или их фрагменты, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные переменные области антитела (Knappik et al., (2000), J. Mol. Biol. 296:57-86; Krebs et al., (2001), J. Immunol. Meth. 254:67-84; Vaughan et al., (1996), Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., (1998), PITAS (USA), 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, (1991), J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., (1991), J. Mol. Biol. 222:581). CD38-связывающие переменные домены можно выделить, например, из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, в виде белков, слитных с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в публикации SShi et al., (2010), J. Mol. Biol. 397:385-96 и международной патентной публикации № WO 09/085462. Можно проводить скрининг библиотек антител в отношении связывания с внеклеточным доменом CD38 человека, дополнительно характеризовать полученные положительные клоны, из лизатов клонов выделять Fab и впоследствии клонировать в виде полноразмерных антител. Такое применение способов фагового дисплея для выделения антител человека принято в данной области техники. См., например, патенты США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Участок Fc антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) или комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ). Такая функция может быть опосредована связыванием эффекторного(ых) домена(ов) Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или связыванием эффекторного(ых) домена(ов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредованный(ые) Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит(ят) к ингибированию и/или истощению клеток-мишеней, например CD38-экспрессирующих клеток. Изотипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 показывают различную способность к выполнению эффекторных функций. АЗКЦ может быть опосредована IgG1 и IgG3, ADCP может быть опосредован IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а CDC может быть опосредована IgG1 и IgG3.

Антитела, которые по существу идентичны антителу, содержащему VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, можно применять в способах изобретения. В контексте данного документа термин "по существу идентичный" означает, что сравниваемые аминокислотные последовательности VH или VL двух антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, не оказывающие отрицательного влияния на свойства антитела. Процентное значение идентичности можно определять, например, путем попарного выравнивания с применением настроек по умолчанию в модуле AlignX программы Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности настоящего изобретения можно применять в качестве искомой последовательности при осуществлении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для выполнения таких поисков, являются программы XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Вестборо, штат Массачусетс, США) с использованием на-

строек по умолчанию. Типовые замены, которые можно проводить для антител, специфически связывающихся с CD38, представляют собой, например, консервативные замены на аминокислоты, имеющие аналогичный заряд, гидрофобные свойства или стереохимические характеристики. Также можно осуществлять консервативные замены для улучшения свойств антитела, например стабильности или аффинности, или для улучшения эффекторных функций антитела. Можно осуществить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, например, в тяжелой или легкой цепи антитела к CD38. Более того, любой нативный остаток в VH или VL также можно замещать аланином, как ранее было описано в отношении аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan et al., *Acta Physiol Scand Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv Biophys.* 35:1-24, 1998). Специалисты в данной области могут определять желательные аминокислотные замены, когда такие замены необходимы. Аминокислотные замены можно осуществлять, например, с помощью ПЦР-мутагенеза (патент США № 4683195). Библиотеки вариантов можно создавать с помощью хорошо известных способов, например путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), и скрининга библиотек на варианты с желательными свойствами. Созданные варианты можно тестировать на их связывание с CD38, их способность индуцировать ADCC, ADCP или апоптоз или модулировать ферментативную активность CD38 *in vitro* с применением способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, может связывать человеческий CD38 в некотором диапазоне аффинности (KD). В одном варианте осуществления в соответствии с изобретением и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, связывается с CD38 с высокой аффинностью, например со значением KD, равным или составляющим менее чем приблизительно 10^{-7} М, таким как, без ограничений, 1-9, 9 (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9) $\times 10^{-8}$, 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} М или любой входящий в него диапазон или значение согласно определению методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Kineха, как практикуется специалистами в данной области. В одном примере значение аффинности равно 1×10^{-8} М или менее. В другом примере значение аффинности равно 1×10^{-9} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает CD38, представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих анти-CD38 антител или области VL и VH, идентифицированные *de novo*, как описано в данном документе, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ между тяжелыми цепями моноспецифических антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как технологии, описанные в патенте США № 7695936; международной патентной публикации № WO 04/111233; патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2007/0287170; международной патентной публикации № WO 2008/119353; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/0286374; патентной публикации США № US2011/0123532; международных патентных публикаций № WO 2011/131746; WO 2011/143545 или патентной публикации США № US2012/0149876. Дополнительными биспецифическими структурами, в которые могут встраиваться области VL и/или VH антител настоящего изобретения, являются, например, иммуноглобулины с двойными вариabельными доменами (международная патентная публикация № WO 2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например "лейциновую застежку-молнию" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO 2012/022811, патенты США № 5932448 и 6833441).

Например, биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в областях СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух родительских моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/13174. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD38) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи, образуя, таким образом, биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубирования можно оптимально вернуть к невосстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЭА), дитиотреитол (ДТТ), дитиозеитритол (ДТЭ), глутатион, трис-(2-карбоксиветил)фосфин (ТКЭФ), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис-(2-карбоксиветил)фосфина. Например, можно использовать

инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например, при pH 7,0 или при pH 7,4.

К возможным иллюстративным мутациям СНЗ в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифического антитела относятся K409R и/или F405L.

Способы в соответствии с изобретением можно применять для лечения пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Введение/фармацевтические композиции.

Антитела, которые специфически связывают CD38, могут быть предоставлены в способах согласно изобретению в подходящих фармацевтических композициях, содержащих антитело, которое специфически связывает CD38, и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, эксципиент или базовый раствор, с которыми вводят антитела, которые специфически связывают CD38. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-ный солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация антител, которые специфически связывают CD38, в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее около 0,5 мас.%, обычно по меньшей мере от около 1 и до 15, или 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 мас.%, и будет преимущественно выбираться на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые базовые растворы и составы, включая другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing, p. 691-1092, см., в особенности с. 958-989.

Способом введения антител, которые специфически связывают CD38, в способах согласно изобретению может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное или подкожное, ингаляционное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), или другие средства, известные специалисту в данной области техники. Антитела, которые специфически связывают CD38, можно вводить внутриопухолевым путем, в дренирующий участок лимфатического узла для местной доставки в опухоль с применением известных способов.

Антитела, которые специфически связывают CD38, можно вводить пациенту любым приемлемым способом, например парентерально путем внутривенной (в.в.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутривенно. в. в. инфузию можно осуществлять, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая пациенту, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 до около 100 мг/кг, например, от около 0,05 до около 30 мг/кг, или от около 5 до около 25, или около 4, около 8, около 16, или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, антитела, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения можно вводить в дозе 8 или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель, с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Антитела, которые специфически связывают CD38, можно вводить в способах изобретения в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода 6 месяцев или более.

Например, антитела, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения можно вводить в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, или, альтернативно, по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч, или в любой их комбинации.

Антитела, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака. Это может быть особенно полезно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

Антитела, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Антитела, которые специфически связывают CD38, в способах изобретения, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В способах изобретения антитела, которые специфически связывают CD38, можно вводить вместе с любым одним или более из химиотерапевтических лекарственных средств или другими противораковыми терапевтическими средствами, известными в данной области. Химиотерапевтические агенты представляют собой химические соединения, подходящие для лечения рака, включают ингибирующие рост или другие цитотоксические агенты и включают алкилирующие агенты, антиметаболические средства, ингибиторы микротрубочек, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ингибиторы роста сосудов и т.п. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Цитоксан®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерид, преднимустин, трофосфамид, урацила иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзрубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиномицин, пуромицин, хеламицин, родорубин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиюганин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауредин, кармофур, цитарабин, дидезоксиридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиандрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; пополнители фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдатраксат; дефофамин; деменколин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглойд; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенозаоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепу; представителей семейства таксоидов или таксанов, таких как паклитаксел (Таксол®) доцетаксел (Таксотер®) и их аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкрестин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДФМО); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторов тирозинкиназ и/или ангиогенеза, включая Нексавар® (сорафениб), Сутент® (сунитиниб), Вотриент™ (пазопаниб), Палладия™ (тоцераниб), Зактима™ (вандетаниб), Рецентин® (цедираниб), регорафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестаургиниб (СЕР-701), Тарцева® (эрлотиниб), Иресса™ (гефитиниб), Гилотриф® (афатиниб), Тайкерб® (лапатиниб), нератиниб и т.п., а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из перечисленных

выше агентов. Также данное определение включает антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют воздействие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогеновые вещества, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и Фарестон® (торемифен); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из перечисленных выше агентов. Другие традиционные химические соединения цитотоксического действия, описанные в Wiemann et al., 1985, in Medical Oncology (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

Типовые агенты, которые можно применять в комбинации с антителом, которое специфически связывает CD38, в способах изобретения включают ингибиторы тирозинкиназ и нацеленные противораковые препараты, такие как Иресса™ (гефитиниб) и Тарцева® (эрлотиниб), а также другие антагонисты HER2, HER3, HER4 или VEGF. Типовые антагонисты HER2 включают CP-724-714, HERCEPTIN™ (трастузумаб), Omnitarg™ (пертузумаб), TAK-165, Тайкерб® (лапатиниб) (ингибитор EGFR и HER2) и GW-282974. Типовые антагонисты HER3 включают антитела к HER3 (см., например, патентную публикацию США № 2004/0197332). Типовые антагонисты HER4 включают миРНК к HER4 (см., например, Maatta et al., Mol. Biol. Cell, 17:67-79, 2006,. Типовой антагонист VEGF представляет собой Авастин™ (бевацизумаб).

Типовые агенты, которые можно применять в комбинации с антителом, которое специфически связывает CD38, в способах изобретения включают стандартные лекарственные препараты для лечения солидных опухолей или ингибиторы иммунных контрольных точек.

Второй терапевтический агент в способах изобретения может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-LAG3 антитело, анти-TIM3 антитело или анти-CTLA-4 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-LAG3 антитело или антагонистическое анти-TIM3 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-L1 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-L2 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-LAG3 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-TIM3 антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA-4 антитело.

Любые антагонистические анти-PD-1 антитела можно применять в способах изобретения. Типовыми анти-PD-1 антителами, которые можно применять, являются Опдиво® (ниволумаб) и Кейтруда® (пембролизумаб). Опдиво® (ниволумаб) описано, например, в патенте США № 8008449 (антитело 5C4) и содержит VH с SEQ ID NO: 24 и VL с SEQ ID NO: 25. Кейтруда® (пембролизумаб) описано, например, в патенте США № 8354509 и содержит VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23. Аминокислотные последовательности ниволумаба и пембролизумаба также доступны в реестре CAS. Дополнительные анти-PD-1 антитела, которые можно применять, описаны в патенте США № 7332582, патентной публикации США № 2014/0044738, международной патентной публикации № WO2014/17966 и патентной публикации США № 2014/0356363.

"Антагонист" относится к молекуле, которая при связывании с клеточным белком подавляет по меньшей мере один тип реакции или активности, индуцируемый лигандом белка. Молекула является антагонистом, если происходит подавление по меньшей мере одного типа реакции или активности по меньшей мере на около 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% по сравнению с подавлением по меньшей мере одного типа реакции или активности в отсутствие антагониста (например, в отрицательном контроле), или когда подавление является статистически значимым по сравнению с подавлением в отсутствие антагониста. Антагонистом может быть антитело, растворимый лиганд, небольшая молекула, ДНК или РНК, такая как миРНК. Типичный тип реакции или активности, который индуцируется, например, связыванием PD-1 со своим рецептором PD-L1 или PD-L2, может представлять собой снижение пролиферации антигенспецифических клеток CD4⁺ или CD8⁺ или снижение выработки интерферона-γ (IFN-γ) Т-клетками, что приводит к подавлению иммунных ответов против, например, опухоли.

Типичный тип реакции или активности, который индуцируется, например, связыванием TIM-3 со своим рецептором, таким как галектин-9, может представлять собой снижение пролиферации антигенспецифических клеток CD4⁺ или CD8⁺, снижение выработки IFN-γ Т-клетками или снижение поверхностной экспрессии CD137 на клетках CD4⁺ или CD8⁺, что приводит к подавлению иммунных ответов против, например, опухоли. Следовательно, антагонистическое антитело к PD-1, специфически связывающее PD-L1, антагонистическое антитело к PD-L2, антагонистическое антитело, специфически связывающее TIM-3, индуцирует иммунные ответы посредством ингибирования ингибиторных путей.

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN
FNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 23

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAstyle
SGVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 24

QVQLVESGGGVVQGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 25

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGGKVEIK

Анти-PD-L1 антитела, которые усиливают иммунный ответ, можно применять в способах согласно изобретению (например, антагонистические анти-PD-L1 антитела). Типовыми анти-PD-L1 антителами, которые можно применять, являются дурвалумаб, атезолизумаб и авелумаб и те, которые описаны, например, в патентной публикации США № 2009/0055944, патентах США № 8552154, 8217149 и 779108.

Дурвалумаб содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 27.

Атезолизумаб содержит VH с SEQ ID NO: 28 и VL с SEQ ID NO: 29.

Авелумаб содержит VH с SEQ ID NO: 30 и VL с SEQ ID NO: 31.

SEQ ID NO: 26

EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN
IKQDGESEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
GWFGEIAFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 27

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPLPWFQGT
VEIK

SEQ ID NO: 28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTY
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 29

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQYLYHPATFGGKVEIK

SEQ ID NO: 30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 31

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSNRFGSGSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGKVTVL

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 24 и VL с SEQ ID NO: 25, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, вклю-

специфически связывает CD38, в комбинации с антагонистическим анти-PD-L1 антителом в течение времени, достаточного для лечения рака легкого.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего рак легкого, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в комбинации с антагонистическим анти-PD-L2 антителом в течение времени, достаточного для лечения рака легкого.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего рак простаты, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в комбинации с антагонистическим анти-PD-1 антителом в течение времени, достаточного для лечения рака простаты.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего рак простаты, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в комбинации с антагонистическим анти-PD-L1 антителом в течение времени, достаточного для лечения рака простаты.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего рак простаты, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, в комбинации с антагонистическим анти-PD-L2 антителом в течение времени, достаточного для лечения рака простаты.

Анти-LAG-3 антитела, которые усиливают иммунный ответ, можно применять в способах согласно изобретению. Типовые анти-LAG-3 антитела, которые можно применять, включают описанные, например, в международной патентной публикации № WO 2010/019570.

Анти-CTLA-4 антитела, которые усиливают иммунный ответ, можно применять в способах согласно изобретению. Типовым анти-CTLA-4 антителом, которое можно применять, является ипилимумаб.

Анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-PD-L2, анти-LAG3, анти-TIM3 и анти-CTLA-4 антитела, которые можно применять в способах согласно изобретению, также можно создавать *de novo*, применяя описанные в данном документе способы.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитела, содержащие VH с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 33, являются применимыми.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитела, содержащие VH с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 35, являются применимыми.

В некоторых вариантах осуществления анти-TIM-3 антитела, содержащие VH с SEQ ID NO: 36 и VL с SEQ ID NO: 37, являются применимыми.

В некоторых вариантах осуществления анти-TIM-3 антитела, содержащие VH с SEQ ID NO: 38 и VL с SEQ ID NO: 39, являются применимыми.

SEQ ID NO: 32
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGLEWMGGIIPFDNAN
 YAKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 33
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 34
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLSVAYISGGGANTY
 YLDNVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCASPYLSYFDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 35
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKSASQSIGIP
 ARFSGSGSGTEFTLTITSSLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 36
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLWVSAISGSGGSTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 37
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQGGHAPITFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 38
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLWMAIYPGDGDIR
 YTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQRNYFDYWGQGTITVTS
 S

SEQ ID NO: 39
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCGQSYPTFGQGTKLEIK

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 33, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 35, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в комбинации с анти-TIM-3 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 36 и VL с SEQ ID NO: 37, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5 в комбинации с анти-TIM-3 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 38 и VL с SEQ ID NO: 39, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В способах согласно изобретению комбинацию антитела, которое специфически связывает CD38, и второго терапевтического агента можно вводить в любых подходящих временных рамках. Например, антитело, которое специфически связывает CD38, и второй терапевтический агент можно вводить пациенту в один и тот же день и даже в одной и той же внутривенной инфузии. Однако антитело, которое специфически связывает CD38, и второй терапевтический агент также можно вводить в чередующиеся дни или чередующиеся недели или месяцы и т.д. В некоторых способах антитело, которое специфически связывает CD38, и второй терапевтический агент можно вводить достаточно близко по времени, чтобы они одновременно присутствовали на обнаруживаемых уровнях (например, в сыворотке) у получающего лечение пациента. В некоторых способах полный курс лечения антителом, которое специфически связывает CD38, состоит из введения ряда доз в течение периода времени, за которым следует или которому

предшествует курс лечения вторым терапевтическим агентом, состоящий из ряда доз. Можно использовать восстановительный период, составляющий 1, 2 или несколько дней или недель, между введением антитела, которое специфически связывает CD38, и второго терапевтического агента.

Антитело, которое специфически связывает CD38, или комбинацию антитела, которое специфически связывает CD38, и второго терапевтического агента можно вводить вместе с любой формой лучевой терапии, включая дистанционную лучевую терапию, лучевую терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), сфокусированное излучение, а также любой формой радиохирургии, включая гамма-нож, кибернож, Linac и интратканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон Gli-aSite), и/или хирургическим лечением.

К способам сфокусированного облучения, которые могут быть использованы, относятся стереотаксическая радиохирurgia, фракционированная стереотаксическая радиохирurgia и радиационная терапия с модуляцией интенсивности (IMRT). Очевидно, что стереотаксическая радиохирurgia включает точную доставку излучения в опухолевую ткань, например, опухоли мозга, одновременно исключая попадание в окружающие нормальные ткани, не пораженные опухолью. Доза излучения, применяемая в ходе стереотаксической радиохирургии, может меняться обычно от 1 до около 30 Гр и может включать промежуточные интервалы, включая, например, дозы от 1 до 5, 10, 15, 20, 25 и до 30 Гр. Поскольку при этом используются неинвазивные фиксирующие устройства, стереотаксическое облучение необязательно осуществлять в ходе разовой процедуры. План лечения можно надежным образом повторять ежедневно, тем самым позволяя воздействовать множественными дробными дозами облучения. При использовании для лечения опухоли в течение определенного времени радиохирургию называют "фракционированной стереотаксической радиохирургией" или FSR. Напротив, стереотаксическая хирургия предполагает облучение за один сеанс.

Фракционированная стереотаксическая радиохирurgia может обеспечивать высокий терапевтический индекс, т.е. высокий показатель уничтожения опухолевых клеток и низкий уровень воздействия на здоровую ткань. Опухоль и здоровая ткань различным образом реагируют на высокие разовые дозы облучения по сравнению с дробными меньшими дозами облучения. Разовые высокие дозы облучения могут уничтожать больше здоровой ткани, чем несколько меньших доз облучения. Соответственно, множественные мелкие дозы облучения могут уничтожать больше опухолевых клеток, не затрагивая здоровую ткань. Доза излучения, применяемая в ходе фракционированной стереотаксической радиохирургии, может меняться обычно от 1 до около 50 Гр и может включать промежуточные интервалы, например дозы от 1 до 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 и до 50 Гр в гиподифракционированных дозах. Может также использоваться радиационная терапия с модуляцией интенсивности (IMRT). IMRT представляет собой современный метод высокоточной трехмерной конформной радиационной терапии (3DCRT), который использует управляемые компьютером линейные ускорители для воздействия точными дозами облучения на злокачественную опухоль или конкретные области внутри опухоли. В 3DCRT форма профиля каждого луча облучения настраивается таким образом, чтобы соответствовать профилю мишени в видоискателе луча (BEV) с помощью многолепесткового коллиматора (MLC), который в результате обеспечивает несколько лучей. IMRT позволяет более точно настраивать дозу облучения в соответствии с трехмерной (3D) формой опухоли за счет модуляции интенсивности луча облучения во множестве малых объемов. Соответственно, IMRT позволяет концентрировать более высокие дозы облучения на областях внутри опухоли, сводя к минимуму дозу облучения окружающих здоровых важнейших образований. IMRT улучшает возможность приведения в соответствие объема обработки с вогнутыми формами опухоли, например, если опухоль образуется вокруг уязвимой области, например спинного мозга, или важного органа, или кровеносного сосуда.

Подкожное введение фармацевтических композиций, содержащих антитело, которое специфически связывается с CD38 и с гиалуронидазой.

Антитело, которое специфически связывает CD38, можно подкожно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело, которое специфически связывает CD38, и гиалуронидазу.

Концентрация антитела, которое специфически связывает CD38, в фармацевтической композиции для подкожного введения может составлять около 20 мг/мл.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 1200 до около 1800 мг антитела, которое специфически связывает CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела, которое специфически связывает CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела, которое специфически связывает CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела, которое специфически связывает CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 30000 до около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 30000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 30000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать гиалуронидазу rHuPH20 с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 40.

rHuPH20 представляет собой рекомбинантную гиалуронидазу (рекомбинантный HYLENEX®) и описана в международной патентной публикации № WO 2004/078140.

Гиалуронидаза представляет собой фермент, который разлагает гиалуроновую кислоту (ЕС 3.2.1.35) и снижает вязкость гиалуронана во внеклеточном матриксе, повышая, таким образом, проницаемость ткани.

SEQ ID NO: 40

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSIQVFTFLIPCCLTNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEF
CLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIIDSITGVTVNGGIPQKISLQDH
LDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK
AKQEFEEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWS
LWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF
LSQDELVTYTFGETVALGASGIVIGTSLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQV
LCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSC
KEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVVA
SL

Введение фармацевтической композиции, содержащей антитело, которое специфически связывает CD38, и гиалуронидазу, можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или дольше. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, фармацевтическую композицию, содержащую антитело, которое специфически связывает CD38, и гиалуронидазу, можно вводить один раз в неделю в течение восьми недель с последующим введением один раз в две недели в течение 16 недель с последующим введением один раз в четыре недели. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1200 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 30000 Ед. гиалуронидазы, причем концентрация антитела, которое специфически связывает CD38, в фармацевтической композиции составляет около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1800 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 45000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 30000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела, которое специфически связывает CD38, и около 45 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело, которое специфически связывает CD38, и гиалуронидазу, можно вводить подкожно в брюшную область.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело, которое специфически связывает CD38, и гиалуронидазу, можно вводить общим объемом около 80, 90, 100, 110 или 120 мл.

Для введения можно смешать 20 мг/мл антитела, которое специфически связывает CD38, в 25 mM ацетате натрия, 60 mM хлориде натрия, 140 mM D-манните, 0,04% полисорбате-20, pH 5,5 с rHuPH20, 1,0 мг/мл (75-150 кЕд./мл) в 10 mM L-гистидине, 130 mM NaCl, 10 mM L-метионине, 0,02% полисорбате-80, pH 6,5 перед введением смеси субъекту.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты осуществления изобретения будут дополнительно описаны в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

Дополнительные варианты осуществления изобретения

Ниже изложены некоторые дополнительные варианты осуществления изобретения в соответствии с описаниями, представленными в других частях настоящего документа. Элементы из вариантов осуществления изобретения, изложенных выше, описанные как связанные с изобретением, раскрытым в настоящем документе, также относятся ко всем без исключения из этих дополнительно пронумерованных вариантов осуществления.

1. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для лечения пациента, имеющего солидную опухоль.
2. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для лечения пациента, имею-

шего опосредованное регуляторными Т-клетками (T_{reg}) заболевание.

3. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для лечения пациента, имеющего опосредованное миелоидными супрессорными клетками (МСК) заболевание, включающего введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывает CD38.

4. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для подавления активности регуляторных Т-клеток (T_{reg}), включающего приведение регуляторных Т-клеток в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

5. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для подавления активности миелоидных супрессорных клеток (МСК), включающего приведение МСК в контакт с антителом, которое специфически связывает CD38.

6. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающего снижение числа регуляторных Т-клеток у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

7. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения для лечения пациента, имеющего солидную опухоль, включающего снижение числа миелоидных супрессорных клеток (МСК) у пациента путем введения пациенту антитела, которое специфически связывает CD38.

8. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, при этом антитело вызывает иммунный ответ у пациента.

9. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, при этом иммунный ответ представляет собой ответ эффекторных Т-клеток (T_{eff}).

10. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-9, при этом ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD4^+$ или Т-клетками $CD8^+$.

11. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантами осуществления 9 или 10, при этом ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD8^+$.

12. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-11, при этом ответ T_{eff} состоит в повышении числа Т-клеток $CD8^+$, повышении пролиферации Т-клеток $CD8^+$, повышении клонального размножения Т-клеток, повышении образования клеток памяти $CD8^+$, повышении антигензависимой выработки антител или повышении выработки цитокинов, хемокинов или интерлейкинов.

13. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-12, отличающееся тем, что антитело ингибирует функцию иммунных супрессорных клеток.

14. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-13, отличающееся тем, что иммунные супрессорные клетки представляют собой регуляторные Т-клетки (T_{reg}) или миелоидные супрессорные клетки (МСК).

15. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 14, отличающееся тем, что T_{reg} представляют собой т-клетки $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{dim}$.

16. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантами осуществления 14 или 15, отличающееся тем, что T_{reg} экспрессируют CD38.

17. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 13-16, отличающееся тем, что функция T_{reg} ингибируется посредством уничтожения T_{reg} .

18. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 17, отличающееся тем, что уничтожение T_{reg} опосредовано антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ), клеточнозависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или апоптозом, индуцированным антителом, которое специфически связывает CD38.

19. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 17, 18, отличающееся тем, что уничтожение T_{reg} опосредовано АЗКЦ.

20. Способ по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что происходит уничтожение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 60% T_{reg} .

21. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 14, отличающееся тем, что МСК представляют собой клетки $CD11b^+ HLA^+ DR^+ CD14^+ CD33^+ CD15^+$.

22. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 21, отличающееся тем, что клетки $CD11b^+ HLA^+ DR^+ CD14^+ CD33^+ CD15^+$ экспрессируют CD38.

23. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из

вариантов осуществления 21, 22, отличающееся тем, что функция МСК ингибируется посредством уничтожения МСК.

24. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 23, отличающееся тем, что уничтожение МСК опосредовано антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ), клеточнозависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или апоптозом, индуцированным антителом, которое специфически связывает CD38.

25. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 23, 24, отличающееся тем, что уничтожение МСК опосредовано АЗКЦ.

26. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 23-25, отличающееся тем, что происходит уничтожение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 60% МСК.

27. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 14-26, отличающееся тем, что T_{eff} или иммунные супрессорные клетки находятся в костном мозге или в периферической крови.

28. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 14-27, отличающееся тем, что солидная опухоль представляет собой меланому, рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), непласкоклеточный НМКРЛ, колоректальный рак, рак простаты, кастрационно-резистентный рак простаты, рак желудка, рак яичника, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, карциному пищевода и желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак фаллопиевой трубы, рак головного мозга, рак уретры, урогенитальный рак, эндометриоз, рак шейки матки или метастатическое поражение раком.

29. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-28, отличающееся тем, что в солидной опухоли отсутствует экспрессия CD38.

30. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-29, отличающееся тем, что антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

31. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-30, отличающееся тем, что антитело связывается, по меньшей мере, с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

32. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-31, отличающееся тем, что антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

33. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-32, отличающееся тем, что антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

34. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-33, отличающееся тем, что антитело содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно.

35. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-34, отличающееся тем, что антитело содержит VH, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 4, и VL, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 5.

36. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-31, отличающееся тем, что антитело содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

37. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-2 9, отличающееся тем, что антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3:

- a. VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;
- b. VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;
- c. VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или
- d. VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

38. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом

осуществления 37, отличающееся тем, что анти-CD38 антитело содержит:

- а. VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;
- б. VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;
- в. VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или
- г. VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

39. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-38, отличающееся тем, что антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

40. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 39, отличающееся тем, что второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, нацеленную противораковую терапию, стандартный лекарственный препарат для лечения солидных опухолей или ингибитор иммунных контрольных точек.

41. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 40, отличающееся тем, что ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-LAG3 антитело, анти-TIM3 антитело или анти-CTLA-4 антитело.

42. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с вариантом осуществления 39, отличающееся тем, что второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или раздельно.

43. Антитело, которое специфически связывает CD38, для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-42, отличающееся тем, что пациента лечат лучевой терапией.

44. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль.

45. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23.

46. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 24 и VL с SEQ ID NO: 25.

47. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента.

48. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23.

49. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 24 и VL с SEQ ID NO: 25.

50. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 27.

51. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 28 и VL с SEQ ID NO: 29.

52. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента, имеющего солидную опухоль, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 30 и VL с SEQ ID NO: 31.

53. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 27.

54. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 28 и VL с SEQ ID NO: 29.

55. Антитело, которое специфически связывает CD38, содержащее VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для применения для повышения иммунного ответа у пациента, при этом антитело вводят в комбинации с анти-PD-L1 антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 30 и VL с SEQ ID NO: 31.

Пример 1. Общие способы и материалы.

Сбор и обработка образцов.

Периферическую кровь и аспираты костного мозга собирали в гепаринизированные пробирки в исходный момент времени непосредственно перед первой инфузией и в определенные моменты времени на протяжении лечения. Большую часть образцов анализировали методом проточной цитометрии в режиме реального времени, когда они поступали в центральную лабораторию через 24-48 ч после сбора. Моно-

нуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали из цельной крови, выделяли посредством центрифугирования в градиенте плотности и хранили в замороженном виде до проведения анализа. Для анализа активации Т-клеток, клональности и супрессии CD38⁺ T_{reg} одновременно анализировали образцы, полученные до и после лечения, используя замороженные образцы МКПК.

Анализ этих образцов методом проточной цитометрии проводили в глобальной центральной лаборатории BARC для оценки NK-, Т-, В-клеток, клеток миеломы (CD138⁺) и экспрессии CD38 с применением ранее валидированного анализа иммунофенотипирования. Вкратце, образцы крови и образцы костного мозга окрашивали следующими мультифлуорохромными панелями антител: панель клеточной линии дифференцировки: PerCP-Cy5.5-CD19 (cloneHIB19; Becton Dickinson [BD]), APC-CD24 (SN3; eBioscience), PC7-CD3 (UCHT-1; Beckman Coulter), V500-CD16 (3G8; BD) и PE-CD56 (MY; BD); панель регуляторных Т-клеток (T_{reg}): APC-CD25 (2A3; BD), PE-CD127 (HIL-7R-M21; BD), APC-H7-CD4 (RPA-T4; BD), PerCP-Cy5.5-CD8 (RPA-T4; BD), PE-CD62L (SK11; BD) и APC-CD45RA (HI100; BD). Экспрессию CD38 оценивали, используя меченое Alexa 647 антитело mAb 003, описанное в патенте США № 7829693, имеющее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15. Образцы крови готовили, применяя разные способы лизирования и промывки. В случае образцов аспиратов костного мозга проводили мембранное или внутриклеточное окрашивание различными антителами. Лизисный раствор Becton Dickinson FACS использовали для лизиса красных кровяных телец в образцах периферической крови, а реагенты для пермеабилзации клеток Fix и Perm от Invitrogen использовали для внутриклеточного окрашивания образцов аспиратов костного мозга. Оценку окрашенных образцов проводили на проточном цитометре FACS Canto II, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FACS Diva. Абсолютное количество популяций иммунных клеток в образцах крови и в виде процентной доли лимфоцитов в образцах костного мозга определяли для всех исследуемых моментов времени.

Секвенирование рецепторов Т-клеток (РТК).

Разнообразие Т-клеток анализировали путем глубокого секвенирования перестроек РТК для оценки клональности Т-клеток CD8⁺, используя геномную ДНК из образцов МКПК. Секвенирование РТК проводили, используя коммерческий метод анализа Immunoseq™ от Adaptive Biotechnologies, а анализ проводили, используя предварительно оцененный многоканальный анализ с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) (TR2015CRO-V-019), который включал применение прямых и обратных праймеров, которые были нацелены непосредственно на семейство вариабельных (V) генов (прямые праймеры) и соединительных (J) генов (обратные праймеры). Праймер для каждого из V и J генов действовал в качестве праймирующих пар для амплификации соматически рекомбинированных РТК, а каждый праймер содержал специальную универсальную последовательность ДНК. После ПЦР-амплификации каждый ампликон амплифицировали второй раз с применением прямых и обратных праймеров, содержащих универсальную последовательность и адапторную последовательность, необходимую для секвенирования ДНК с помощью Illumina.

Т-клеточные ответы на вирусные и аллоантигены.

МКПК пациентов высевали в 96-луночные планшеты (2×10⁵ клеток/лунку) и стимулировали в течение 5 дней коктейлем из 23 вирусных пептидов, рестриктированных по главному комплексу гистосовместимости (ГКГС) класса I, из человеческого цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барра (ЭБВ) и вируса гриппа (2 мкг/мл; пул пептида CEF; PANATecs®) или эквивалентное число облученных дозой 25 Гр аллогенных МКПК от здоровых доноров. Нестимулированные МКПК и МКПК, стимулированные покрытыми анти-CD3/CD28 гранулами, служили в качестве отрицательного и положительного контролей соответственно. На 5 день определяли количество интерферона-γ (IFN-γ) из бесклеточного супернатанта методом сэндвичевого ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA; ELISA Ready-SET-Go для человеческого ИНФ-гамма; eBioscience), что служило в качестве суррогатного маркера активации Т-клеток.

Подавление регуляторными Т-клетками (T_{reg}) эффекторных клеточных функций: Анализ разведения карбоксифлуоресцеин сукцинимидила (CFSE).

МКПК от здоровых доноров метили PerCP-Cy5.5-CD3 (SK7; BD), KO-CD45, (J33; Beckman Coulter), V450-CD4 (SK3; BD), PE-CD25 (M-A251, BD), PE Cy7-CD127 (HIL-7R-M21; BD) и APC-CD38 (HB-7; BD) и сортировали методом FACS Aria (BD). Отсортированные эффекторные клетки метили сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE; eBioscience) и стимулировали покрытыми анти-CD3/CD28 гранулами в присутствии или отсутствии CD38⁺T_{reg} или CD38⁺T_{reg} (1:1 соотношение между T_{reg} и эффекторными клетками) в RPMI плюс 10% фетальная бычья сыворотка. Через 72 ч проводили анализ методом проточной цитометрии, а в качестве суррогата пролиферации Т-клеток использовали процентное разведение CFSE.

Фенотипирование миелоидных супрессорных клеток (МСК) и опосредованная Дарзалеком™ (даратумумаб) АЗКЦ.

МКПК от трех нормальных здоровых доноров культивировали совместно с опухолевыми клеточ-

ными линиями миеломы (RPMI8226, U266, H929) в течение шести дней и оценивали в отношении выработки гранулоцитарных МСК (Г-МСК) (CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD15⁺CD33⁺), как описано в Gorgun et al., Blood, 121:2975-87, 2013. Г-МСК не присутствовали в нормальных здоровых МКПК, однако после совместного культивирования со всеми тремя клеточными линиями миеломы Г-МСК присутствовали в количестве 5-25% от общей популяции МКПК (данные не показаны). Стратегия гейтинга для оценки методом проточной цитометрии Г-МСК включала CD11b⁺ в качестве первого гейта, за чем следовал гейтинг CD14⁺ и HLA-DR⁺, а затем следовал гейтинг CD15⁺ и CD33⁺. Проводили клеточную сортировку Г-МСК и оценивали в отношении уровней экспрессии CD38 и чувствительности к опосредованной ДарзалексомTM (даратумумабом) АЗКЦ. Чтобы оценить влияние ДарзалексаTM (даратумумаба) на АЗКЦ/КЗЦ МСК, в анализ АЗКЦ добавляли сыворотку, содержащую комплемент или изотипический контроль.

Анализ наивных Т-клеток и Т-клеток памяти.

Гепаринизированные образцы периферической крови получали от пациентов перед каждой инфузией ДарзалексаTM (даратумумаба). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Huраque и хранили в криоконсервирующей среде (RPMI с дополнением 10% человеческой сыворотки и 10% диметилсульфоксида) в жидком азоте. Для анализа FACS МКПК размораживали и ресуспендировали 2х10⁶ клеток/панель в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с 0,05% азида и 0,1% HAS.

Анализ данных.

Весь анализ данных и построение соответствующих графиков проводили исключительно с помощью программного обеспечения R (R: Язык и среда для статистических расчетов, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org/>). Все проходящие лечение субъекты с оцениваемым ответом были включены в анализ данных. Соответственно, в тексте пациенты с ответом определены как субъекты с наилучшим ответом на IRC sCR, ОХЧР и ЧР, а пациенты без ответа определены как субъекты с наилучшим ответом на IRC MO, СЗ и ПЗ.

Разные статистические сравнения включали (i) базовые уровни для пациентов с ответом и без ответа, (ii) сравнение базовых уровней и уровней после лечения для пациентов с ответом и без ответа, (iii) процентное изменение для пациентов с ответом и без ответа, (iv) изменения в соотношении между базовыми уровнями и уровнями после лечения. Каждое сравнение включало первый критерий в отношении нормальности по критерию Шапиро-Уилка (Royston (1995), Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: W-критерий в отношении нормальности. Applied Statistics, 44, 547-551). Было обнаружено, что данные практически исключительно не имеют нормальное распределение. Дифференциальный уровень исследования включал применение непараметрического рангового критерия Уилкокса (Hollander and Wolfe (1973), Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons, p. 27-33 (одновыборочный), 68-75 (двухвыборочный) и t-критерия с последующим преобразованием Бокса-Кокса (Weisberg, S. (2014), Applied Linear Regression, Fourth Edition, Wiley Wiley, Chapter 7). В случае преобразования Бокса-Кокса к величинам, равным нулю, добавляли небольшое число (1e-07). Во всех случаях результаты обоих тестов были согласованы. Р-значения, полученные по ранговому критерию Уилкокса, приведены в таблицах в тексте данного документе, если не указано иное. Когда проводили исследование различий между базовым уровнем и уровнем после лечения для пациентов с ответом и без ответа, применяли двухгрупповой парный критерий, во всех других случаях применяли двухгрупповой непарный критерий.

Так как образцы для анализа различных популяций лимфоцитов получали в одинаковые моменты времени для разных режимов дозирования, проводили моделирование популяций. Подбор модели проводили по порядку визитов. Моделирование популяций для общего количества и активированных НК-клеток включало аппроксимацию моделью разломанного стержня (Lutz et al., "Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data". Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 678.2 (2009), 118-122.). Линейными моделями со смешанными эффектами со случайной секущей и наклоном аппроксимировали данные по субпопуляциям В-клеток, Т-клеток, а также популяциям лейкоцитов, моноцитов, нейтрофилов и гранулоцитов пациентов (Bates et al., (2014). "lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4." ArXiv e-print; Поданная в Journal of Statistical Software, <http://arxiv.org/abs/1406.5823>). Это линейное моделирование со смешанными эффектами проводили в соответствующий день после начала лечения (ADY). Аппроксимацию линейной моделью со смешанными эффектами проводили для log-преобразованных переменных ответа. В случае, если переменные значения ответа были равны нулю, ко всем переменным значениям ответа добавляли 0,1, чтобы сделать возможным моделирование в лог-шкале.

Пример 2. Дизайн исследования 54767414MMY2002 (SIRIUS).

Целевая популяция для исследования 54767414MMY2002 (SIRIUS) представляет собой пациентов с поздней стадией множественной миеломы, которые получали по меньшей мере 3 предшествующие линии терапии, включая ингибитор протеасом (PI) и иммуномодулирующий лекарственный препарат (IMiD), или являются вдвойне рефрактерными в отношении PI и IMiD. Оценки восприимчивости для

анализа первичной конечной точки/конечного анализа были основаны на оценках независимого наблюдательного комитета (ННК) и компьютеризированного алгоритма с применением руководства 2011 IMWG (Отчет о клиническом исследовании: Открытое, многоцентровое, исследование фазы 2 эффективности и безопасности Дарзалекса™ (даратумумаба) у субъектов с множественной миеломой, которые получали по меньшей мере 3 предшествующие линии терапии (включая ингибитор протеасом и IMiD), или являются вдвойне рефрактерными в отношении ингибитора протеасом и IMiD (EDMS-ERI-92399922; de Weers et al., (2011), J. Immunol. 186(3):1840-1848).

Эти оценки включали общий уровень ответа (ОУО), длительность ответа, время до ответа и наилучший ответ, уровень клинической пользы, время до прогрессирования (ВДП), выживаемость без прогрессирования (ВБП) и общую выживаемость (ОВ).

Всего в этом исследовании Дарзалексом™ (даратумумабом) лечили 124 субъекта (de Weers et al., (2011), J. Immunol. 186(3):1840-1848). 18 субъектов лечили 8 мг/кг, а 106 субъектов лечили 16 мг/кг. Режим дозирования был следующим:

Группа А: Дарзалекс™ (даратумумаб) 16 мг/кг: Циклы 1 и 2: Дни 1, 8, 15 и 22 (еженедельно), циклы 3-6: Дни 1 и 15 (раз в две недели), цикл 7+: День 1 (каждые 4 недели). Каждый цикл длился 4 недели.

Группа В: Дарзалекс™ (даратумумаб) 8 мг/кг: Цикл 1+: День 1 (каждые 4 недели).

Основной целью исследования было определение эффективности 2 режимов лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) согласно данным ОУО (ПР+ЧР) у субъектов с множественной миеломой, которые получали по меньшей мере 3 предшествующие линии терапии, включая PI и IMiD, или чье заболевание является вдвойне рефрактерным в отношении PI и IMiD (Отчет о клиническом исследовании: Открытое, многоцентровое, исследование фазы 2 эффективности и безопасности Дарзалекса™ (даратумумаба) у субъектов с множественной миеломой, которые получали по меньшей мере 3 предшествующие линии терапии (включая ингибитор протеасом и IMiD), или являются вдвойне рефрактерными в отношении ингибитора протеасом и IMiD. EDMS-ERI-92399922).

Вторичные цели этого исследования включали оценку безопасности и переносимости Дарзалекса™ (даратумумаба), демонстрацию дополнительных определений эффективности (например, клинической пользы, ВДП, ВБП и ОВ) наряду с оценкой фармакокинетики, иммуногенности, фармакодинамики и исследованием биомаркеров, прогнозирующих ответ на Дарзалекс™ (даратумумаб). Дополнительная информация относительно исследования доступна из протокола клинического исследования (Отчет о клиническом исследовании: Открытое, многоцентровое, исследование фазы 2 эффективности и безопасности Дарзалекса™ (даратумумаба) у субъектов с множественной миеломой, которые получали по меньшей мере 3 предшествующие линии терапии (включая ингибитор протеасом и IMiD), или являются вдвойне рефрактерными в отношении ингибитора протеасом и IMiD. EDMS-ERI-92399922).

На стадии 1 части 1, 1 субъект (6%) демонстрировал ответ в группе с 8 мг/кг и 5 субъектов (31%) демонстрировали ответ в группе с 16 мг/кг. Следовательно, только группа с 16 мг/кг была продлена на стадию 2 части 1 и в часть 2.

В группе с 16 мг/кг 31 субъект достигал ответа 40 или выше на основании оценки ННК; ОУО составлял 29% (95% ДИ: 21%, 39%). Три субъекта (3%) достигли sCR, а 13 субъектов (12%) достигли ОХЧР или лучше.

Пример 3. Действие Дарзалекса™ (даратумумаба) на размножение и активность Т-клеток у пациентов, включенных в исследование 54767414MMY2002 (SIRIUS).

CD38 экспрессируется во многих иммунных и гемопоэтических клетках. Проводили широкое иммунное профилирование методом проточной цитометрии для изучения действия Дарзалекса™ (даратумумаба) на подгруппы иммунных клеток и связи базовых уровней этих клеток с клиническим ответом. Различные популяции клеток, включая Т-клетки (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и регуляторные Т-клетки (T_{reg})), В-клетки (CD19⁺), NK-клетки, моноциты (CD14⁺), лейкоциты и нейтрофилы оценивали методом проточной цитометрии в периферической крови и аспиратах костного мозга на базовом уровне и после лечения Дарзалексом™ (даратумумабом), чтобы отследить изменения в этих клеточных популяциях у пациентов с ответом и без ответа.

Лимфоциты, лейкоциты, моноциты и нейтрофилы.

Число лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов исследовали в периферической крови у пациентов с ответом и без ответа. Было обнаружено, что общее число лимфоцитов было повышено после лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) у пациентов с ответом при применении обеих доз - 8 и 16 мг/кг (фиг. 1). Линейное моделирование со смешанными эффектами выявило повышение, составляющее $0,8 \times 10^6$ клеток/мкл в log-шкале за 100 дней (ДИ = 0,06, 0,11). Небольшие повышения были обнаружены для моноцитов и лейкоцитов со значительным повышением, составляющим $0,03 \times 10^6$ клеток/мкл (ДИ = 0,01, 0,04) и $0,03 \times 10^6$ клеток/мкл в log-шкале (ДИ=0,01, 0,05) за каждые 100 дней соответственно. Медианное число нейтрофилов согласовалось с базовым уровнем и значительно не варьировалось, хотя в случае некоторых пациентов была отмечена нейтропения.

Базовые уровни этих клеточных популяций сравнивали между группами с ответом. После применения знакового рангового критерия Уилкоксона не было получено сведений о том, что базовые уровни

являются разными для любых из этих типов клеток среди групп с ответом (табл. 1).

Таблица 1

Число клеток периферической крови у пациентов с ответом и без ответа на базовом уровне.					
	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	P-значение*
Лейкоциты: О	33	4,3	4,32 (1,65)	(1,6; 8,8)	
Лейкоциты: БО	82	4,19	4,77 (2,26)	(2,13; 13,8)	0,60987
Лимфоциты: О	33	0,9	1,09 (0,59)	(0,27; 2,67)	
Лимфоциты: БО	82	1	1,05 (0,55)	(0,3; 2,8)	0,85028
Моноциты: О	33	0,43	0,5 (0,25)	(0,2; 0,97)	
Моноциты: БО	82	0,5	0,51 (0,25)	(0,04; 1,3)	0,72803
Нейтрофилы: О	33	2,47	2,54 (1,23)	(1,06; 5,94)	
Нейтрофилы: БО	82	2,44	3,05 (2,08)	(1; 11,7)	0,40373
N: число образцов на группу					
О: пациент с ответом					
БО: пациент без ответа					
*пациент без ответа по сравнению с пациентом с ответом					
СО: стандартное отклонение					

НК-клетки.

Общее число НК-клеток ($CD16^+CD56^+$) и активированных НК-клеток ($CD16^+CD56^{dim}$) было снижено при лечении ДарзалексомTM (даратумумабом) в течение времени (данные не показаны).

В-клетки.

Абсолютное число В-клеток ($CD45^+CD3^+CD19^+$) определяли в периферической крови или аспиратах костного мозга во время лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) в течение времени у пациентов с ответом и без ответа. Число В-клеток немного повысилось в цельной крови и сохранялось в аспиратах костного мозга. Линейное моделирование со смешанными эффектами для В-клеток выявило минимальное повышение, составляющее $0,1 \times 10^6$ клеток/мкл [ДИ = 0,04, 0,16 за 100 дней в log-шкале в течение курса лечения ДарзалексомTM (даратумумабом). Не наблюдалось изменений в процентном содержании В-клеток ($CD45^+CD3^+CD19^+$ /лимфоцитов) в аспиратах костного мозга во время лечения даратумумабом как у пациентов с ответом, так и без ответа ($p=0,1$ и $0,4$ соответственно). Кроме того, не было получено свидетельств, что число В-клеток отличается на базовом уровне у пациентов с ответом и без ответа ($p=0,5$).

Т-клетки.

Было отмечено, что число лимфоцитов возросло при лечении ДарзалексомTM (даратумумабом) (фиг. 1), несмотря на то, что В-клетки демонстрировали только минимальное повышение в количестве (см. выше). Для получения дополнительных данных исследовали различные популяции Т-клеток (Т-клетки $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, регуляторные Т-клетки) как в периферической крови, так и в костном мозге.

Число Т-клеток $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ было повышено в периферической крови (как абсолютное число/мкл, так и процентное содержание лимфоцитов) после лечения ДарзалексомTM (даратумумабом). На фиг. 2 показано процентное изменение абсолютного числа Т-клеток $CD3^+$ ($CD45^+CD3^+$) от базового уровня в периферической крови в течение времени для каждого пациента. Черной линией на фигуре указано медианное абсолютное число $\times 10^6$ клеток/мкл для всех пациентов. На фигуре были включены данные только для визитов с более чем 2 наблюдениями. На фиг. 3 показан % изменения абсолютного числа Т-клеток $CD4^+$ ($CD45^+CD3^+CD4^+$) от базового уровня в периферической крови в течение времени для каждого пациента. Черной линией на фигуре указано медианное значение для всех пациентов. На фигуре были включены данные только для визитов с более чем 2 наблюдениями. На фиг. 4 показан % изменения абсолютного числа Т-клеток $CD8^+$ ($CD45^+CD3^+CD8^+$) от базового уровня в периферической крови в течение времени для каждого пациента. Черной линией на фигуре указано медианное значение для всех пациентов. На фигуре были включены данные только для визитов более чем с 2 наблюдениями. Линейное моделирование со смешанными эффектами для абсолютного числа клеток выявило в среднем повышение общего числа Т-клеток ($CD45^+CD3^+$), составляющее $0,13 \times 10^6$ клеток/мкл в log-шкале за каждые 100 дней (ДИ = 0,1, 0,15) после лечения ДарзалексомTM (даратумумабом). Было обнаружено, что число Т-клеток $CD8^+$ значительно возросло на $0,16 \times 10^6$ клеток/мкл в log-шкале за каждые 100 дней (ДИ = 0,13, 0,19). Было обнаружено, что число Т-клеток $CD4^+$ умеренно возросло на $0,11 \times 10^6$ клеток/мкл в log-шкале

за каждые 100 дней (ДИ = 0,09, 0,13).

В случае каждой из субпопуляций Т-клеток пациенты с ответом демонстрировали более высокое максимальное процентное изменение абсолютного числа клеток от базового уровня, чем пациенты без ответа (CD3⁺ $p=3,2993 \times 10^{-5}$; CD4⁺ $p=3,486 \times 10^{-5}$; CD8⁺ $p=2,7172 \times 10^{-5}$; регуляторные Т-клетки $p=0,002$). В табл. 2 приведены результаты знакового рангового критерия Уилкоксона для сравнения каждой субпопуляции Т-клеток в периферической крови между пациентами с ответом и без ответа для процентного изменения абсолютного числа от базового уровня.

Таблица 2

Процентное изменение абсолютного числа клеток; периферическая кровь					
Образец	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	P-значение*
CD45+CD3+: О	33	86,76	118,91 (104,07)	(-16,1; 398,71)	
CD45+CD3+: БО	80	28,08	43,02 (69,55)	(-67,11; 286,67)	3,30E-05
CD45+CD3+CD4+: О	33	72,08	77,74 (60,99)	(-21,05; 233,21)	
CD45+ CD3+CD4+: БО	80	19,48	29,36 (59,58)	(-68; 298,89)	3,49E-05
CD45+ CD3+CD8+: О	33	106,6	180,81 (192,37)	(-7,07; 760,51)	
CD45+ CD3+CD8+: БО	80	32,24	63,96 (112,44)	(-66,22; 588,89)	2,72E-05
N: число образцов на группу					
О: пациент с ответом					
БО: пациент без ответа					
*пациент с ответом по сравнению с пациентом без ответа					
СО: стандартное отклонение					

Аналогичным образом было обнаружено, что общее число Т-клеток (CD45⁺CD3⁺ в виде процентного содержания лимфоцитов) и Т-клеток CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺CD8⁺ в виде процентного содержания лимфоцитов) значительно возросло во время лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) как у пациентов с ответом, так и у пациентов без ответа (пациенты с ответом на CD3⁺ $p=3,8147 \times 10^{-6}$, без ответа $p=9,8225 \times 10^{-5}$; пациенты с ответом на CD8⁺ $p=3,8147 \times 10^{-6}$, без ответа $p=0,0003$). В медианном значении для Т-клеток CD4⁺ в костном мозге в любой группе с клиническим ответом изменений не наблюдали. В табл. 3 приведены результаты знакового рангового критерия Уилкоксона для различных Т-клеток в виде % лимфоцитов в костном мозге.

На фиг. 5 показано процентное содержание (%) клеток CD45⁺CD3⁺ в течение времени во время лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) (в график включены как пациенты с ответом, так и без ответа).

На фиг. 6 показан % клеток CD45⁺CD3⁺CD8⁺ в течение времени во время лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) (в график включены пациенты как с ответом, так и без ответа).

Таблица 3

Популяции Т-клеток (% лимфоцитов) в костном мозге					
Образец		БО: Базовый уровень	БО: При лечении	О: Базовый уровень	О: При лечении
CD45+CD3+/ лимфоциты	N	29	29	19	19
	Медиана	72,2	83,6	77,9	91,4
	Среднее значение (стандартное отклонение)	68,57 (13,64)	80,93 (11,57)	71,82 (14,92)	87,67 (9,49)
	Диапазон	(36,3; 94,5)	(50,9; 97,4)	(42,2; 94,8)	(63,3; 97,2)
	P-значение*		9,8225e-05		3,8147e-06
CD45+CD3+CD4+/ лимфоциты	N	29	29	19	19
	Медиана	33,7	29,2	22,7	22,8
	Среднее значение (стандартное отклонение)	31,24 (12,14)	32,96 (12,57)	24,18 (7,37)	24,29 (9,58)
	Диапазон	(6,3; 54,2)	(9,6; 60,9)	(8,1; 36,6)	(12,5; 45,4)
	P-значение*		0,18351		0,98432
CD45+CD3+CD8+/ лимфоциты	N	29	29	19	19
	Медиана	36,3	43,3	49,4	66,9
	Среднее значение (стандартное отклонение)	37,39 (13,64)	47,74 (18,14)	46,91 (14,89)	62,82 (12,79)
	Диапазон	(15,9; 67,2)	(18,5; 81)	(24,5; 79,6)	(33,1; 83,3)
	P-значение*		0,00026883		3,8147e-06
N: число образцов на группу					
О: пациент с ответом					
БО: пациент без ответа					
*Сравнение базового уровня и уровня при лечении для групп пациентов с ответом и без ответа					
СО: стандартное отклонение					

Хотя как пациенты с ответом, так и пациенты без ответа продемонстрировали повышение числа Т-клеток в периферической крови и костном мозге, пациенты с ответом имели наибольшее процентное изменение от базового уровня. Чтобы понять, имеют ли пациенты с ответом или пациенты без ответа разные базовые уровни Т-клеток CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ перед лечением Дарзалексом™ (даратумумабом), сравнивали базовые измерения в периферической крови для каждой подгруппы.

Статистически значимая разница отсутствовала между пациентами с ответом и без ответа для абсолютного числа Т-клеток на базовом уровне в периферической крови (табл. 4) или для процентного содержания Т-клеток в общем числе лимфоцитов в периферической крови (табл. 5) по знаковому ранговому критерию Уилкоксона.

Таблица 4

Абсолютное число клеток в периферической крови до лечения на базовом уровне					
Образец	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	P-значение*
CD45+CD3+: О	33	574	715,91 (472,54)	(186; 2096)	
CD45+CD3+: БО	80	638	672,5 (426,36)	(85; 2407)	0,81527
CD45+CD3+CD4+: О	33	190	276,91 (207,39)	(77; 1085)	
CD45+CD3+CD4+: БО	80	214	251,61 (146,13)	(21; 766)	0,94965
CD45+CD3+CD8+: О	33	332	424,55 (324,49)	(93; 1238)	
CD45+CD3+CD8+: БО	80	318	398,14 (354,52)	(43; 2221)	0,56555
N: число образцов на группу					
О: пациент с ответом					
БО: пациент без ответа					
*пациенты с ответом и без ответа на тип клетки					
СО: стандартное отклонение					

Таблица 5

Т-клетки (% лимфоцитов) в костном мозге до лечения					
Образец	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	значение p
CD45+CD3+: О	23	78,4	73,66 (14,43)	(42,2; 94,8)	
CD45+CD3+: БО	65	76,5	73,5 (13,93)	(36,3; 94,5)	0,81232
CD45+CD3+CD4+: О	23	25	25,57 (8,32)	(8,1; 41,4)	
CD45+CD3+CD4+: БО	65	25,3	27,53 (12,76)	(6,3; 55,2)	0,76482
CD45+CD3+CD8+: О	23	50	47,7 (13,73)	(24,5; 79,6)	
CD45+CD3+CD8+: БО	65	44,3	44,73 (15,49)	(15,9; 76,1)	0,41678
N: число образцов на группу					
О: пациент с ответом					
БО: пациент без ответа					
*пациенты с ответом и без ответа на тип клетки					
СО: стандартное отклонение					

Регуляторные Т-клетки.

Клетки T_{reg} были определены в образце как популяция клеток $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$. Соотношение между Т-клетками $CD8^+$ и T_{reg} оценивали в периферической крови и костном мозге у пациентов, которых лечили ДарзалексомTM (даратумумабом) в течение времени. Соотношение возросло как в периферической крови, так и в костном мозге. На фиг. 7А приведены медианные значения соотношений клеток $CD8^+/T_{reg}$ и $CD8^+/CD4^+$ в периферической крови всех пациентов для каждой временной точки. На фиг. 7В приведены медианные значения соотношений Т-клеток $CD8^+/T_{reg}$ и $CD8^+/CD4^+$ в костном мозге всех пациентов для каждой временной точки. Изменения в соотношениях абсолютного числа $CD8^+ T_{reg}$ и $CD8^+/CD4^+$ были существенными в периферической крови во время лечения (табл. 6) и в костном мозге (табл. 7) согласно знаковому ранговому критерию Уилкоксона.

В анализе объединенных данных исследования SIRIUS и GEN501 (пример 6) медианные соотношения клеток $CD8^+/CD4^+$ и $CD8^+/T_{reg}$ в периферической крови были повышены на 8 неделю ($p=5,1 \times 10^{-5}$ для $CD8^+/CD4^+$ и $p=1,8 \times 10^{-7}$ для $CD8^+/T_{reg}$) и на 16 неделю ($p=0,00017$ для $CD8^+/CD4^+$ и $p=4,1 \times 10^{-7}$ для $CD8^+/T_{reg}$). Аналогично, в костном мозге медианные соотношения клеток $CD8^+/CD4^+$ и $CD8^+/T_{reg}$ были повышены при лечении (неделя 12+1 цикл) по сравнению с базовым уровнем ($p=0,00016$ для $CD8^+/CD4^+$ и $p=2,8 \times 10^{-7}$ для $CD8^+/T_{reg}$). Между пациентами с ответом и без ответа значительной разницы не наблюдали.

Таблица 6

Соотношения Т-клеток в периферической крови					
Образец	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	P-значение*
CD8+/CD4+: Базовый уровень	66	119,75	191,78 (231,09)	(24,17; 1461,18)	
CD8+/CD4+: C3D1	66	204,86	222,96 (167,44)	(25,53; 867,58)	0,00046409
CD8+/CD4+: C4D1	66	210,05	215,15 (151,31)	(25,86; 798,83)	0,00042154
CD8+/Treg: Базовый уровень	66	1258,33	2338,46 (3465,12)	(206,82; 18550)	
CD8+/Treg: C3D1	66	2326,74	3361,87 (3661,61)	(155; 23066,67)	5,25E-06
CD8+/Treg: C4D1	66	2763,16	3382,86 (3629,69)	(316,67; 22087,5)	9,95E-08
*сравнение с базовым уровнем; N: число образцов на группу; СО: стандартное отклонение					

Таблица 7

Соотношения Т-клеток в костном мозге					
Образец	N	Медиана	Среднее значение (стандартное отклонение)	Диапазон	P-значение*
CD8+/CD4+ (/лимфоциты): Базовый уровень	31	163,18	184,4 (129,5)	(32,58; 674,58)	
CD8+/CD4+ (/лимфоциты): При лечении	31	221,89	240,85 (155,57)	(30,38; 666,4)	0,0038599
CD8+/Treg (/лимфоциты): Базовый уровень	30	1219,58	1802,73 (1582,7)	(306,41; 7960)	
CD8+/Treg (/лимфоциты): При лечении	30	2273,56	3905,72 (4232,73)	(451,22; 20825)	3,15E-07
*сравнение с базовым уровнем; N: число образцов на группу; СО: стандартное отклонение					

Пример 4. Дизайн исследования (GEN501).

В исследовании GEN501 (NCT00572488) Дарзалекс™ (даратумумаб) оценивали в качестве монотерапии для вдвойне рефрактерных пациентов с ММ. Выделение, обработку образцов и статистический анализ проводили, как описано в Примере 1 и Примере 2. Исследование было описано в Lokhorst et al., N Eng. J. Med. 373:1207-19, 2005.

Вкратце, исследование GEN501 было первым клиническим исследованием на людях Дарзалекса™ (даратумумаба) у субъектов с ММ. Оно представляет собой исследование фазы 1/2 с повышением дозы, исследованием безопасности, разделенное на 2 части. Часть 1 представляет собой открытое исследование с повышением дозы; Часть 2 представляет собой открытое, неконтролируемое исследование с несколькими группами на основании уровней доз, установленных в части 1.

В части 1 оценивали 10 уровней доз Дарзалекса™ (даратумумаба): 0,005, 0,05, 0,10, 0,50, 1, 2, 4, 8, 16 и 24 мг/кг. В 2 группе с наименьшей дозой было определено по 1 (+3) субъекту в каждую, а стандартное определение по 3 (+3) субъекта применяли к оставшимся 8 группам дозирования.

Часть 2 представляла собой открытое, неконтролируемое исследование, включающее два уровня доз - 8 и 16 мг/кг.

Часть 1 включала 32 субъекта, а часть 2 включала 72 субъекта.

Пример 5. Лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) индуцирует клональность Т-клеток у пациентов.

Учитывая размножение Т-клеток CD8⁺, отмеченное как в периферической крови, так и в костном мозге в исследовании MY2002, проводили высокоэффективное секвенирование нового поколения рецеп-

торов Т-клеток (РТК) с применением анализа Immunoseq™ для определения того, были ли размножающиеся Т-клетки CD8⁺ клоновыми по природе, что указывает на адаптивный иммунный ответ. Всего оценивали 17 образцов пациентов от субъектов, включенных в исследование GEN501 (n=6 пациентов с ответом, т.е. \geq ЧР; n=11 пациентов без ответа, т.е. МО, СЗ, ПЗ).

Секвенирование РТК выявило, что лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) значительно повышает клоновость среди пациентов.

На фиг. 8А показана корреляция между клоновостью Т-клеток до и после лечения Дарзалексом™ (даратумумабом) (p=0,0056).

На фиг. 8В показана кратность изменения в клоновости у отдельных пациентов. Пациенты с ответом отмечены звездочкой. Эти данные позволяют предположить, что отмеченное размножение Т-клеток при лечении Дарзалексом™ (даратумумабом) может быть клоновым по природе.

У пациентов с ответом наблюдалось большее общее размножение в репертуаре РТК (согласно данным по изменению численности, ИВЧ) по сравнению с пациентами без ответа.

На фиг. 8С показан % ИВЧ для отдельных пациентов. Группа А: пациенты с ответом, Группа В: пациенты без ответа. Статистически значимую разницу наблюдали между пациентами с ответом и пациентами без ответа (p=0,037).

На фиг. 8D приведена сумма абсолютного изменения в численности (ИВЧ) у пациентов с ответом и без ответа для каждого размноженного Т-клеточного клона.

На фиг. 8Е показан максимум % ИВЧ для каждого отдельного пациента. Группа А: пациенты с ответом, Группа В: пациенты без ответа. Статистически значимую разницу наблюдали между пациентами с ответом и пациентами без ответа (p=0,048).

На фиг. 8F показан максимум ИВЧ для одного Т-клеточного клона у пациентов с ответом (группа А) и пациентов без ответа (группа В).

ИВЧ получали путем определения значимой разницы в клоновой численности между двумя образцами, используя точный критерий Фишера (DeWitt et al. J. Virol. 2015) и суммируя абсолютное изменение в численности для каждого размноженного клона.

Пример 6. Иммуномодулирующее действие Дарзалекса™ (даратумумаба) у пациентов, включенных в исследование GEN501

Различные популяции Т- и В-клеток оценивали у пациентов с ответом и без ответа, включенных в исследование GEN501.

Лимфоциты.

Как и в исследовании SIRIUS (MMY2002), число лимфоцитов как в периферической крови, так и в костном мозге повышалось во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Это увеличение было связано с повышенным числом клеток CD4⁺ и CD8⁺.

Центральные клетки памяти CD8⁺.

Т-клеточный фенотип CD8⁺ исследовали у пациентов, которых лечили Дарзалексом™ (даратумумабом) в течение времени в подгруппе из 17 пациентов, включенных в исследование GEN 501. Клетки CD8⁺ от пациентов были определены как наивные клетки (CD45RO⁻/CD62L⁺) (TN) или центральные клетки памяти (TCM) (CD45RO⁺/CD62L^{high}) с помощью стандартных протоколов.

На фиг. 9А показан % наивных клеток CD8⁺ (% клеток CD8⁺), а на фиг. 9В показан % центральных клеток памяти CD8⁺. Лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) значительно снижало количество наивных Т-клеток CD8⁺ (p=1,82×10⁻⁴ на 8 неделю) и повышало количество Т-клеток памяти CD8⁺ (p=4,88×10⁻² на 8 неделю). Это позволяет предположить наличие перехода от наивных цитотоксических Т-клеток к Т-клеткам памяти, которые могут быть активированы против конкретного антигена. Белыми квадратами указаны пациенты, которые достигли, по меньшей мере, минимального ответа (\geq МО), а черными квадратами указаны пациенты, которые имели стабильное заболевание или прогрессирующее заболевание. Значительно большее снижение числа наивных Т-клеток CD8⁺ было очевидным у пациентов, восприимчивых к лечению (данные не показаны). На фиг. 9С показано, что лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) повышало процентное содержание рестриктивных по HLA класса I Т-клеток, которые частично стимулируют вирус-специфически и аллореактивные Т-клеточные ответы.

На фиг. 9D показано, что размножающиеся эффекторные Т-клетки памяти экспрессировали низкие уровни CD38. Важно отметить, что эти Т-клетки проявляют нормальную и даже повышенную функциональную активность против вирусных пептидов и аллоантигенов (см. пример 8). Из этих функциональных результатов заявители сделали выводы, что существует размножение или улучшение активности антиген-обученных Т-клеток против вирусных и аллоантигенов во время лечения Дарзалексом™ (даратумумабом). Эти данные позволяют предположить, что в отличие от регуляторных подгрупп клеток для надлежащего функционирования и размножения эффекторных Т-клеток не требуется экспрессия CD38.

CD38-положительные регуляторные Т-клетки.

Наблюдение интенсивного размножения и повышения активности цитотоксических Т-клеток вместе с недавними литературными данными, в которых указано, что несколько иммуносупрессивных клеточных подгрупп экспрессируют CD38, подтолкнуло к изучению действия Дарзалекса™ (даратумумаба)

на популяцию регуляторных Т-клеток (T_{reg}), миелоидных супрессорных клеток (МСК) и регуляторных В-клеток (B_{reg}).

Регуляторные Т-клетки (T_{reg}) ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$) выделяли, используя стандартные протоколы. Частоту появления T_{reg} анализировали методом проточной цитометрии.

Субпопуляция периферических T_{reg} ($10 \pm 10\%$) экспрессировала высокие уровни CD38 до активации T_{reg} . На фиг. 10А, верхняя панель, показана частота появления T_{reg} в популяции клеток $CD3^+CD4^+$ (популяция клеток P4) на базовом уровне. На фиг. 10А, нижняя панель, показана подгруппа T_{reg} с высокой экспрессией CD38 (популяция клеток P5). Эти $CD38^+ T_{reg}$ были очень чувствительны к обработке ДарзалексомTM (даратумумабом) и демонстрировали значительное и практически незамедлительное снижение в численности после первой дозы ДарзалексаTM (даратумумаба) ($n=17$ пациентов; $P=8,88 \times 10^{-16}$ на 1 неделю по сравнению с базовым уровнем). Частота появления T_{reg} после обработки ДарзалексомTM (даратумумабом) показана на фиг. 10В, верхняя панель (популяция клеток P4).

На фиг. 10В, нижняя панель, показано, что $CD38^{high} T_{reg}$ (клетки P5) представляли наиболее истощенную популяцию T_{reg} после первой инфузии ДарзалексаTM (даратумумаба). Эти $CD38^+ T_{reg}$ оставались истощены во время обработки ДарзалексомTM (даратумумабом) ($p=8,88 \times 10^{-16}$, $1,11 \times 10^{-15}$ и $1,50 \times 10^{-11}$ на 1, 4 и 8 недели соответственно по сравнению с базовым уровнем).

На фиг. 10С показан % $CD38^{high} T_{reg}$ из общего числа клеток $CD3^+$ на базовом уровне, на 1 неделю, 4 неделю, 8 неделю, в момент рецидива и через 6 месяцев после окончания лечения (КЛ). $CD38^{high} T_{reg}$ возвращались к базовому уровню в этот момент времени. Изменения в $CD38^+ T_{reg}$ были одинаковы у пациентов, которые отвечали и не отвечали на лечение, однако соотношение Т-клетки $CD8^+ T_{reg}$ было значительно выше на 8 неделю у пациентов, которые демонстрировали ответ на ДарзалексTM (даратумумаб) ($P=0,00955$; фиг. 10D).

Чтобы оценить возможную биологическую значимость истощения $CD38^+ T_{reg}$ лечением ДарзалексомTM (даратумумабом), оценивали экспрессивную способность $CD38^+ T_{reg}$ по сравнению с $CD38^- T_{reg}$ на патологических Т-клетках $CD3^+$. В серии экспериментов, проводимых с образцами от нескольких здоровых доноров, $CD38^+ T_{reg}$ подавляли пролиферацию Т-клеток более интенсивно (9,9% наблюдаемой клеточной пролиферации), чем $CD38^- T_{reg}$ (53,2% наблюдаемой клеточной пролиферации) или отрицательный контроль (74,9% наблюдаемой клеточной пролиферации) (фиг. 10Е).

Так как МСК было нелегко выявить в замороженных образцах МКПК, были созданы гранулоцитарные МСК $CD38^+$ ($CD11b^+CD14^+HLA-DR^+CD15^+CD33^+$) *in vitro* из МКПК, выделенных из организма пациентов на базовом уровне и пациентов, которые получали одну инфузию ДарзалексаTM (даратумумаба).

На фиг. 11 показана гистограмма по данным проточной цитометрии выявленных МСК (верхняя гистограмма, отмеченная квадратом популяция клеток).

Приблизительно половина МСК экспрессировали CD38 (фиг. 11, средний график; отмеченная кругом популяция клеток P7). МСК $CD38^{high}$ были практически истощены у пациентов, которых лечили ДарзалексомTM (даратумумабом) (фиг. 11, нижний график; отмеченная кругом популяция клеток P7).

Неспецифические МСК линии дифференцировки $CD38^{high}$ были истощены после лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) в течение времени как у пациентов без ответа, так и у пациентов по меньшей мере с минимальным ответом на лечение.

На фиг. 12 показано, что процентное содержание МСК $CD38^{high}$ было снижено практически до 0% у пациентов на 1, 4 или 8 неделю лечения. Неспецифические МСК линии дифференцировки $CD38^{high}$ вернулись к базовому уровню после окончания лечения.

Пациенты с наибольшими популяциями $CD38^+$ в пределах линии дифференцировки неспецифических МСК демонстрировали наилучшие и наиболее длительные ответы на лечение ДарзалексомTM (даратумумабом).

На фиг. 13 показано, что пациенты 2, 4, 15, 16 и 17, имеющие наибольшее процентное содержание МСК $CD38^{high}$ (как показано на фиг. 11) и определенные как пациенты с 40 или МО, демонстрировали выживаемость без прогрессирования (ВБП) по меньшей мере 8 месяцев.

Неспецифические МСК линии дифференцировки $CD38^{high}$ были также чувствительны к индуцированной ДарзалексомTM (даратумумабом) АЗКЦ *in vitro*. Анализ АЗКЦ проводили, используя МСК $CD38^{high}$ от двух доноров и клетки Daudi в качестве контрольных клеток-мишеней с соотношением эффекторные клетки:клетки-мишени 50:1.

На фиг. 14 показаны результаты эксперимента для одного донора. ДарзалексTM (даратумумаб) индуцировал лизис клеток МСК.

Определение $CD38^+ B_{reg}$ проводили у пациентов, которых лечили ДарзалексомTM (даратумумабом) ($n=16$), и, как и $CD38^+ T_{reg}$, они были истощены после первой дозы ДарзалексаTM (даратумумаба) ($p=0,0018$ на 1 неделю по сравнению с базовым уровнем; парный ранговый критерий Уилкоксона) и оставались на низком уровне, пока пациенты проходили лечение (фиг. 15А). Отсортированные методом FACS B_{reg} при стимуляции вырабатывали IL-10 (фиг. 15В).

Вместе эти наблюдения позволяют предположить, что истощение иммуносупрессивных МСК

CD38⁺, B_{reg} и T_{reg} является важным механизмом, обеспечивающим вклад в индуцированные ДарзалексомTM (даратумумабом) изменения в популяциях и клональности Т-клеток.

Пример 7. Клетки МСК CD38⁺ присутствуют у раковых пациентов

Процентное содержание МСК (Лин. -CD14⁺HLADR⁻/низк) и их экспрессию CD38 исследовали в периферической крови пациентов с НМКРЛ или раком простаты с помощью проточной цитометрии.

Процентное содержание МСК составляло около 10-37% и около 10-27% МКПК в анализируемых образцах от пациентов с НМКРЛ или раком простаты соответственно. Экспрессия CD38 была выявлена в 80-100% Лин. -CD14⁺HLADR⁻/низк МСК из МКПК пациентов с НМКРЛ и в 70-100% МСК из МКПК пациентов с раком простаты.

Пример 8. ДарзалексTM (даратумумаб) усиливает противовирусные Т-клеточные ответы.

Для дополнительной оценки действия ДарзалексаTM (даратумумаба) на активацию и функциональность Т-клеток, определяли выработку IFN-γ из периферических Т-клеток в ответ на вирусные и аллоантигены у пациентов, которых лечили ДарзалексомTM (даратумумабом) (n=7), с диапазоном клинических результатов. Пациенты с 40 или лучше демонстрировали значительное повышение секреции IFN-γ в ответ на вирусные и аллоантигены после лечения ДарзалексомTM (даратумумабом) по сравнению с базовым уровнем по меньшей мере для одного момента времени на протяжении лечения, что позволяет предположить, что функция Т-клеток не нарушается низкой экспрессией CD38 (см. пример 6, фиг. 9C). Аналогично с данными по клональности РТК, это повышение было более значительным у пациентов, которые отвечали на ДарзалексTM (даратумумаб), чем у тех, кто не отвечал.

На фиг. 16A показан противовирусный ответ типового пациента с ОХЧР.

На фиг. 16B показан противовирусный ответ типового пациента с ПР.

На фиг. 16C показан противовирусный ответ типового пациента с ПЗ.

На фиг. 16D показан противовирусный ответ типового пациента с МО.

На фигурах планки погрешностей представляют стандартную погрешность среднего в двойных культурах. Звездочка обозначает статистически значимые изменения между указанными сравнениями. Показан наилучший ответ на независимый наблюдательный комитет. В соответствии с этими результатами вирус-реактивные Т-клетки у пациентов с ОХЧР (фиг. 16E) или ПР (фиг. 16F) демонстрировали повышение пролиферативной способности во время лечения ДарзалексомTM (даратумумабом).

Пример 9. Механизм чувствительности CD38-экспрессирующих подтипов иммунных клеток к ДарзалексуTM (даратумумабу).

Данные обоих исследований, GEN501 и SIRIUS, свидетельствуют об истощении некоторых иммунных клеток, которые экспрессируют CD38 (NK-клетки, регуляторные Т-клетки (T_{reg}), регуляторные В-клетки (B_{reg}) и миелоидные супрессорные клетки (МСК)), тогда как остальные клетки, которые экспрессируют CD38, увеличиваются в числе (цитотоксические и хелперные Т-клетки) при терапии ДарзалексомTM (даратумумабом).

Чтобы понять механизм чувствительности, оценивали уровни экспрессии CD38 в различных субпопуляциях иммунных клеток у здоровых доноров и пациентов с множественной миеломой, включенных в исследование GEN501 или SIRIUS.

На фиг. 17A приведена гистограмма экспрессии CD38 в иммунных клетках от здорового донора, а на фиг. 17B приведена гистограмма экспрессии CD38 в иммунных клетках от пациента с множественной миеломой. У здорового донора экспрессия CD38 была наибольшей в NK-клетках, затем в моноцитах, В- и Т-клетках. У пациента с множественной миеломой экспрессия CD38 была наибольшей в плазматических клетках, затем в подгруппе В-клеток, NK-клетках, моноцитах, В-клетках и Т-клетках.

На фиг. 17C приведено сравнение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD38 среди NK-клеток, T_{reg}, B_{reg}, В- и Т-клеток от пациентов с рецидивной и рефрактерной миеломой, демонстрирующее, что после плазматических клеток NK-клетки экспрессировали наивысшие уровни CD38, затем регуляторные Т-клетки (T_{reg}) и регуляторные В-клетки (B_{reg}).

Кроме экспрессии CD38, другие белки клеточной поверхности, такие как ингибиторные белки комплемента (C1P; CD46, CD55, CD59), могут вносить свой вклад в чувствительность или устойчивость к ДарзалексуTM (даратумумабу). In vitro оценка C1P среди субпопуляций иммунных клеток позволила обнаружить, что NK-клетки экспрессируют очень низкие уровни CD59 и CD55, тогда как другие популяции Т- и В-клеток экспрессируют намного большие уровни. Это также может вносить свой вклад в вариабельность чувствительности к ДарзалексуTM (даратумумабу) среди подтипов иммунных клеток (данные не показаны).

Обсуждение.

В этом исследовании описано ранее неизвестное иммуномодулирующее действие ДарзалексаTM (даратумумаба) посредством снижения популяций иммуносупрессивных клеток CD38⁺ и одновременной индукции размножения хелперных и цитотоксических Т-клеток, выработки IFN-γ в ответ на вирусные пептиды и повышения клональности РТК, что свидетельствует об улучшении адаптивного иммунного ответа.

Это исследование демонстрирует, что МСК и B_{reg} экспрессируют CD38 и восприимчивы к лечению

Дарзалексом™ (даратумумабом). Известно, что эти клетки присутствуют в опухолевом микроокружении и вносят свой вклад в рост опухоли, иммунную эвазию, ангиогенез, метастазирование и выработку супрессивных цитокинов. Кроме этих супрессивных подгрупп клеток CD38⁺ была выявлена новая субпопуляция регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}), которые также экспрессируют высокие уровни CD38 и демонстрируют превосходную аутологичную Т-клеточную экспрессивную способность. Эти клетки также были чувствительны к Дарзалексу™ (даратумумабу), а их число значительно снижалось у пациентов, получавших лечение. Опосредованное Дарзалексом™ (даратумумабом) уничтожение этих иммунорегуляторных клеток CD38⁺ может снизить локальную иммунную супрессию в пределах микроокружения миеломы и сделать возможным размножение положительных иммунных эффекторных клеток и обеспечение противоопухолевого ответа.

Действительно, наблюдали значительное повышение в широких популяциях Т-клеток, включая CD4⁺ и CD8⁺, как в периферической крови, так и в костном мозге (т.е. опухоли). Специфические субпопуляции CD8⁺ были изменены вследствие терапии Дарзалексом™ (даратумумабом), что включало значительное снижение числа наивных Т-клеток и сопутствующее ему значительное повышение числа эффекторных Т-клеток памяти CD8⁺, что указывает на сдвиг в эффекторных Т-клетках в направлении обученного антигеном фенотипа, который сохраняет иммунологическую память и может быть реактивным против опухолевых антигенов. Соотношения CD8⁺:CD4⁺ и CD8⁺:T_{reg} также значительно возрастали при лечении, демонстрируя сдвиг в сторону положительных иммунных регуляторов по сравнению с отрицательными.

Чтобы оценить, были ли размноженные Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ клоновыми по природе, исследовали репертуар Т-клеток в подгруппе пациентов. Клональность Т-клеток значительно возрастала при лечении Дарзалексом™ (даратумумабом) даже у пациентов, у которых наблюдался наилучший ответ СЗ или прогрессирование. Следовательно, повышение клональности Т-клеток не может происходить исключительно вследствие снижения опухолевой нагрузки. При этом отклонение в клональности Т-клеток было большим у пациентов с хорошим клиническим ответом и коррелировало с повышением числа Т-клеток CD8⁺, что позволяет предположить, что наблюдаемое размножение Т-клеток при лечении Дарзалексом™ (даратумумабом) стимулировалось антигенами. Это примечательно в этой популяции пациентов, которые прошли интенсивное предшествующее лечение (в среднем пять предшествующих линий терапии), и не ожидалось, что они смогут показать сильный противоопухолевый иммунный ответ. Кроме повышения клональности РТК, пациенты с ответом на Дарзалекс™ (даратумумаб) демонстрировали повышенные Т-клеточные ответы на предсуществующие вирусные и аллоантигены, что позволяет предположить выход иммунной системы из иммуносупрессивного состояния.

Лечение Дарзалексом™ (даратумумабом) приводило к снижению числа иммунных супрессивных МСК и регуляторных Т- и В-клеток. Это снижение происходило одновременно с размножением Т-хелперных клеток CD4⁺ и цитотоксических Т-клеток CD8⁺. Т-клеточная клональность и функциональные противовирусные ответы, определяемые по выработке IFN-γ, также возрастали при лечении Дарзалексом™ (даратумумабом). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что Т-клетки продолжали функционировать надлежащим образом, несмотря на низкую экспрессию CD38, и позволяют предположить, что повышение Т-клеточного ответа может происходить вследствие истощения регуляторных клеток. Кроме того, эти изменения в размножении, активности и клональности Т-клеток были ярче выражены у пациентов, восприимчивых к Дарзалексу™ (даратумумабу), по сравнению с невосприимчивыми. Рецидив после терапии Дарзалексом™ (даратумумабом) был связан с обратимым характером многих из этих изменений. Это позволяет предположить дополнительный, ранее неизученный механизм действия Дарзалекса™ (даратумумаба) посредством иммуномодуляции, который может вносить свой вклад в иммунные ответы и эффективность.

Недавно антитела, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы вместо прямого нацеливания на рак, продемонстрировали свою эффективность в ряде случаев. Антитела, ингибирующие CTLA-4 и PD-1, стимулируют размножением Т-клеток и усиливают активацию Т-клеток, что приводит к продлению выживаемости и замедлению повторного появления заболевания у пациентов с поздней стадией солидных опухолей и гематологическими злокачественными образованиями, такими как лимфома Ходжкина. Посредством повышения противоракового иммунитета эти иммуномодулирующие антитела могут не только индуцировать клинические ответы, но также предотвращать повторное появление заболевания.

Пример 10. Сывороточный протеомный анализ субъектов с множественной миеломой, получавших один агент Дарзалекс™ (даратумумаб) в клиническом исследовании 54767414MMY2002 (SIRIUS) части 2.

Сбор и обработка образцов биомаркеров.

Образцы периферической крови собирали в стандартные пробирки для отделения сыворотки (от 2,5 до 5 мл), а аликвоты сыворотки перевозили замороженными SomaLogic, Inc (Boulder, CO) для мультианалитического профилирования сывороточного белка.

Профилирование сывороточного белка проводили на SomaLogic, применяя ранее валидированный

анализ SOMAscan, в котором проводится измерение 1129 белковых аналитов с применением аффинных молекул SOMAmer. Реагенты SOMAmer представляют собой белковые аффинные реагенты на основе одноцепочечной ДНК. В анализе используются небольшие количества образца (150 мкл плазмы) и происходит преобразование белкового сигнала в сигнал SOMAmer, который количественно определяют с помощью обычной микроматрицы ДНК.

Каждый SOMAmer содержит четыре функциональных компонента:

- 1) уникальную последовательность распознавания белка;
- 2) биотин для захвата;
- 3) фоторасщепляемый линкер;
- 4) флуоресцентную молекулу для обнаружения.

В уникальной последовательности распознавания белка используется ДНК, причем она содержит химически модифицированные нуклеотиды, которые имитируют аминокислотные боковые цепи, расширяя разнообразие стандартных аптамеров и повышая специфичность и аффинность взаимодействий белок-нуклеиновая кислота (Gold et al., PLoS One 5:e15004, 2010). Аптамеры выбираются SELEX. Реагенты SOMAmer выбирают, используя белки в их нативной конформации. Следовательно, реагентам SOMAmer требуются интактные третичные белковые структуры для связывания. Несвернутые или денатурированный, предположительно неактивные белки не обнаруживаются реагентами SOMAmer.

Мастер-миксы реагентов SOMAmer группируют по типу образца и разведению. Реагенты предварительно связывают со стрептавидиновыми гранулами перед инкубацией образца. Белки в образцах связывают с когнатными реагентами SOMAmer во время равновесия, промывают, инкубируют с NHS-биотином, промывают, а затем гранулы подвергают воздействию УФ-излучения для отщепления фоторасщепляемого линкера. Элюат содержит реагенты SOMAmer, связанные с мечеными биотином белками. Стрептавидиновый захват и последующие промывки удаляют несвязанные реагенты SOMAmer. Во время конечного элюирования молекулы SOMAmer освобождаются от своих когнатных белков посредством применения денатурирующих условий. Конечный элюат гибридизируют к стандартным ДНК-микроматрицам Agilent, а флуорофоры из молекул SOMAmer количественно определяют в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ). ОЕФ пропорционально количеству белка в образце.

Образцы из исследования MMY2002 исследовали в двух первичных партиях. Первая партия из 180 образцов содержала спаренные образцы сыворотки от 90 субъектов для цикла 1 день 1 (C1D1, базовый уровень) и C3D1 (цикл 3 день 1). 180 образцов анализировали вместе в трех отдельных планшетах SomaScan. Вторая партия образцов содержала 50 C1D1 образцов, включая 35 повторных образцов из партии 1.

Анализы данных.

Входные данные и определения.

В анализ данных были включены проходящие лечение субъекты с оцениваемым ответом. В соответствии с текстом отчета пациенты с ответом определяются как субъекты с наилучшим общим ответом (на IRC, для MMY2002) sCR, ОХЧР и ЧР, субъекты со стабильным заболеванием (СЗ) как субъекты с минимальным ответом (МО) или СЗ, а пациенты без ответа определяются как субъекты с наилучшим общим ответом (на IRC, для MMY2002) прогрессирующего заболевания (ПЗ).

Предварительная обработка данных Somalogic.

Выравнивание партий.

Партии 1 и 2 образцов MMY2002 исследовали на двух разных версиях платформы SOMAscan. Разница между версиями была минимальной и включала три последовательности SOMAmer, которые различались между версиями (CTSE: 3594-6_1 → 3594-6_5, FCN1: 3613-62_1 → 3613-62_5, BMPER: 3654-27_1 → 3654-27_4). Их убрали из анализа.

Измерения для трех планшетов партии 1 выравнивали в соответствии со стандартным процессом межпланшетной калибровки SomaLogic путем определения калибровочных коэффициентов масштабирования для планшета для каждого SOMAmer путем расчета соотношения между специальным глобальным эталонным значением для мастер-микса и медианным значением 7 внутрипланшетных контрольных калибровочных измерений. Коэффициент масштабирования для планшета для каждого реагента SOMAmer применяли к каждому образцу в планшете равным образом.

Учитывая разные версии платформы SOMAscan для партии 1 и 2, проводили систематическую межпартийную коррекцию вариабельности с модифицированным применением стандартного процесса межпланшетной калибровки SomaLogic путем максимального использования повторного измерения по 35 образцам для партий. Для каждого SOMAmer рассчитывали соотношение между послекалибровочным измерением по партии 1 и докалибровочным измерением по партии 2 для каждого из 35 повторных образцов (i, j). Медианное значение по этим 35 соотношениям использовали для определения скорректированного SOMAmer-специфического калибровочного коэффициента масштабирования для образцов партии 2 ($\hat{\tau}_i$). Затем эти калибровочные коэффициенты масштабирования использовали аналогичным образом в стандартной процедуре SOMAscan.

$$r_{i,j} = \left(\frac{\text{Послекалибров. конц. партии } 1, i, j}{\text{Докалибров. конц. партии } 2, i, j} \right), \quad \vec{r}_i = (r_{i,1}, r_{i,2}, \dots, r_{i,j}) \text{ для всех повторных образцов } j$$

$$\text{Калибровочный коэффициент масштабирования } \hat{r}_i = \text{медиана } (\vec{r}_i) = \tilde{r}_i$$

После расчета скорректированных калибровочных коэффициентов масштабирования распределения всех коэффициентов масштабирования для каждой партии в анализе наносили на график для оценки наличия выбросов. 9 SOMAmer с очень большими или маленькими калибраторами ($>0,25$ и <3) убирали из анализа вследствие плохой воспроизводимости.

После завершения выравнивания партии и фильтрования SOMAmer для ММУ2002 применяли \log_2 -преобразование ко всем значениям концентрации белка в ММУ2002, чтобы данные стали больше соответствовать нормальному распределению и чтобы улучшить эффективность параметрических статистических критериев.

Коррекция искажающего фактора.

Оценку части вариации набора данных, объясняемой мета-переменными (такими как демография, класс ответа и момент времени забора образца), и определение потенциальных искажающих факторов проводили посредством анализа основных компонентов в центрированном и масштабированном наборе данных. Использовали простые линейные модели для определения наивысшего ранжированного РС, который был существенным образом связан с каждой из представляющих интерес переменных. Значимость этих связей определяли, используя критерий Вальда, а часть вариабельности РС, объясняемую моделью, оценивали по R2 аппроксимации. Для данных ММУ2002 было обнаружено, что местоположение коррелирует с РС1 и объясняет наибольшую часть вариабельности набора данных ($>7,37\%$, r -значение = $3,71 \times 10^{-9}$). Чтобы снизить влияние эффектов, связанных с местом получения образца, в пределах данных, использовали ComBat28 для коррекции эффектов местоположения.

Повторное объединение образцов.

Данные по 35 образцам, повторяемые для партий 1 и 2 ММУ2002, объединяли, рассчитывая среднее значение для каждого белка.

Анализ дифференциальной концентрации белка пациента с ответом по сравнению с пациентами без ответа.

Статистическое сравнение распределения концентрации белка у пациентов с ответом на Дарзалекс™ (даратумумаб) по сравнению с пациентами без ответа проводили как для базового уровня, так и при лечении, используя два комплементарных способа: (i) критерий суммы рангов Уилкоксона (Hollander and Wolfe, *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons. 1973. 27-33 (один образец), 68-75 (два образца) для каждого отдельного SOMAmer и (ii) анализ Лимма (Ritchie, M.E., et al., *Nucleic Acids Res.* 2015; 20:43(7):e47) для всех SOMAmer одновременно. Все p -значения корректировали, используя метод Бенджамини-Хохберга (BH) для коррекции множественных гипотез (Benjamini and Hochberg, (1995), *J. R. Statist. Soc. B*.57: 289-300; R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011; ISBN 3-900051-07-0). Нулевую гипотезу об отсутствии дифференциальной экспрессии отбрасывали при скорректированном p -значении $<0,05$.

Лечение по сравнению с базовым уровнем.

Базовые уровни белка и уровни при лечении сравнивали, используя три альтернативных статистических метода: (i) двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA6 (ii) знаковый ранговый критерий Уилкоксона и (iii) критерий Фридмана (Johnson et al., (2007), *Biostatistics*, 8 (1):118-127). Все p -значения корректировали относительно контрольного FDR, используя метод BH для коррекции множественных гипотез (Benjamini and Hochberg, *J.R. Statist. Soc. B*.57:289-300, 1995). Кроме значимости лечения, также применяли двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA (Chambers et al., *Analysis of variance; designed experiments: Chapter 5. Statistical Models in S*, Editors J.M Chambers and T.J Hastie. Wadsworth & Brookes/Cole. 1992) для определения возникновения значимой взаимосвязи момент времени:класс ответа для каждого SOMAmer. Модифицированный критерий суммы рангов Уилкоксона применяли в качестве ретроспективного анализа для определения того, демонстрировали ли пациенты с ответом и без ответа разные эффекты от лечения, путем расчета разницы между значениями концентрации белка при лечении и базовой концентрации белка у каждого субъекта и применяя критерий суммы рангов Уилкоксона. Величины значимости корректировали, используя метод BH, а нулевую гипотезу отбрасывали при скорректированном p -значении $<0,05$.

Обучение классификатора.

Данные по базовому уровню белка ММУ2002 использовали для построения классификатора прогнозирования ответа. Подход с вложенными циклами и стратифицированной 10-кратной перекрестной валидацией повторяли 30 раз, используя 4 разных алгоритма машинного обучения: машины опорных векторов (МОВ), случайный лес (СЛ), наивный Байес (НБ) и дерево решений J48. Для каждого алгоритма обучения процедура подготовки начиналась с создания 10 сбалансированных групп набора данных (внешний цикл). Одну из этих групп исключали как тестируемую группу, тогда как 9 оставшихся пере-

ходили на внутренний цикл в качестве группы обучения. В пределах внутреннего цикла группу обучения еще раз разбивали на 10 сбалансированных групп, создавая внутренние наборы обучения и тестирования. Алгоритмы обучения тренировали на каждом из этих внутренних наборов обучения и повторяли этот процесс 30 раз для каждой группы в пределах внешнего цикла. Точность каждого алгоритма обучения внутреннего цикла в прогнозировании внутренних тестовых наборов использовали для выбора характеристик и оптимизации параметров модели. После завершения 30 внутренних циклов для каждой группы обучения оценивали эффективность внешнего цикла (используя оптимизированные параметры и характеристики) для каждой соответствующей тестируемой группы. Затем всю процедуру внешнего цикла повторяли 30 раз, получая 30 прогнозов ответа для каждого образца в пределах набора данных. Статистика по ППК, чувствительности и специфичности, полученная посредством этого циклического подхода, была аппроксимацией того, насколько хорошо конечная модель, обученная по полному исходному набору данных, будет работать с новыми исследуемыми случаями.

Результаты исследования ММУ2002.

Проводили различные сравнения, включая изменения в белковой экспрессии в зависимости от индуктированного лечением ответа. Одним из белков, который продемонстрировал снижение экспрессии у пациентов с ответом в течение времени, был PD-L1, тогда как экспрессия белка PD-L1 возрастала у пациентов без ответа в течение времени. Вовлечение PD-L1 на Т-клетках приводит к снижению функции Т-клеток и повышению развития T_{reg} .

На фиг. 18 приведен профиль экспрессии белка PD-L1 у пациентов с ответом, без ответа и у пациентов со стабильным заболеванием во время цикла 1 и цикла 3.

Вовлечение PD-L1 с его рецептором PD-1 подавляет противоопухолевые ответы и стимулирует отсутствие реакций и истощение Т-клеток. Не желая быть связанным какой-либо конкретной теорией, понижающая регуляция PD-L1 после обработки CD38 также может приводить к усилению противоопухолевых иммунных ответов в солидных опухолях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения иммунного ответа у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывается с CD38 в течение времени, достаточном для повышения иммунного ответа, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно.

2. Способ по п.1, где иммунный ответ представляет собой ответ эффекторных Т-клеток (T_{eff}).

3. Способ по п.2, где ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD4^+$ или Т-клетками $CD8^+$.

4. Способ по п.3, где ответ T_{eff} опосредован Т-клетками $CD8^+$.

5. Способ по п.2, где ответ T_{eff} состоит в повышении числа Т-клеток $CD8^+$, повышении пролиферации Т-клеток $CD8^+$, повышении клонального размножения Т-клеток, повышении образования клеток памяти $CD8^+$, повышении антигензависимой выработки антител, повышении выработки цитокинов, повышении выработки хемокинов или повышении выработки интерлейкинов.

6. Способ по п.1, где антитело, которое специфически связывается с CD38, вводят в количестве, достаточном для ингибирования функции иммуносупрессорных клеток.

7. Способ по п.6, где иммуносупрессорная клетка представляет собой регуляторную Т-клетку (T_{reg}).

8. Способ по п.7, где T_{reg} представляет собой Т-клетку $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$.

9. Способ по п.8, где T_{reg} экспрессирует CD38.

10. Способ по п.9, где функция T_{reg} ингибируется посредством уничтожения T_{reg} .

11. Способ по п.10, где уничтожение T_{reg} опосредовано антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC).

12. Способ по п.6, где иммуносупрессорная клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку (МСК).

13. Способ по п.12, где МСК представляет собой клетку $CD11b^+HLADR^+CD14^+CD33^+CD15^+$.

14. Способ по п.13, где клетка $CD11b^+HLADR^+CD14^+CD33^+CD15^+$ экспрессирует CD38.

15. Способ по п.14, где функция МСК ингибируется посредством уничтожения МСК.

16. Способ по п.15, где уничтожение МСК опосредовано АЗКЦ.

17. Способ по п.6, где иммуносупрессорная клетка представляет собой регуляторную В-клетку (B_{reg}).

18. Способ по п.17, где B_{reg} представляет собой клетку $CD19^+CD24^+CD38^+$.

19. Способ по п.18, где функция B_{reg} ингибируется посредством уничтожения B_{reg} .

20. Способ по п.19, где уничтожение B_{reg} опосредовано ADCC.

21. Способ по п.6, где иммуносупрессорная клетка находится в костном мозге или периферической крови.

22. Способ по любому из пп.1-21, где антитело, которое специфически связывается с CD38,

связывается по меньшей мере с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

23. Способ по любому из пп.1-22, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

24. Способ по любому из пп.1-21, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

25. Способ по любому из пп.1-24, где антитело, которое специфически связывается с CD38, вводят в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек, выбранным из анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-LAG3 антитела, анти-TIM3 антитела или анти-CTLA-4 антитела.

26. Способ по п.25, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело.

27. Способ по п.26, где анти-PD-1 антитело содержит:

- a) VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23;
- b) VH с SEQ ID NO: 24 и VL с SEQ ID NO: 25;
- c) VH с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 33 или
- d) VH с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 35.

28. Способ по п.25, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-L1 антитело.

29. Способ по п.28, где анти-PD-L1 антитело содержит:

- a) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 27;
- b) VH с SEQ ID NO: 28 и VL с SEQ ID NO: 29 или
- c) VH с SEQ ID NO: 30 и VL с SEQ ID NO: 31.

30. Способ по п.25, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-PD-L2 антитело.

31. Способ по п.25, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-LAG3 антитело.

32. Способ по п.25, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-TIM-3 антитело.

33. Способ по п.32, где анти-TIM-3 антитело содержит:

- a) VH с SEQ ID NO: 36 и VL с SEQ ID NO: 37 или
- b) VH с SEQ ID NO: 38 и VL с SEQ ID NO: 39.

34. Способ по любому из пп.25-33, где второй терапевтический агент вводят отдельно.

35. Способ по любому из пп.1-34, где антитело, которое специфически связывается с CD38, вводят внутривенно.

36. Способ по любому из пп.1-34, где антитело, которое специфически связывается с CD38, вводят подкожно в фармацевтической композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с CD38, и гиалуронидазу.

37. Способ по п.36, где гиалуронидаза представляет собой rHuPH20 с SEQ ID NO: 40.

38. Способ по любому из пп.1-37, где пациента лечат или лечили лучевой терапией.

39. Способ по любому из пп.1-37, где пациент проходил или будет проходить хирургическое вмешательство.

40. Способ подавления активности иммунной супрессорной клетки, включающий приведение иммунной супрессорной клетки в контакт с антителом, которое специфически связывается с CD38, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно.

41. Способ по п.40, где иммуносупрессорная клетка представляет собой T_{reg} .

42. Способ по п.41, где T_{reg} представляет собой T-клетку $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$.

43. Способ по п.40, где иммуносупрессорная клетка представляет собой МСК.

44. Способ по п.43, где МСК представляет собой клетку $CD11b^+HLADR^+CD14^+CD33^+CD15^+$.

45. Способ по п.40, где иммуносупрессорная клетка представляет собой B_{reg} .

46. Способ по п.45, где B_{reg} представляет собой клетку $CD19^+CD24^+CD38^+$.

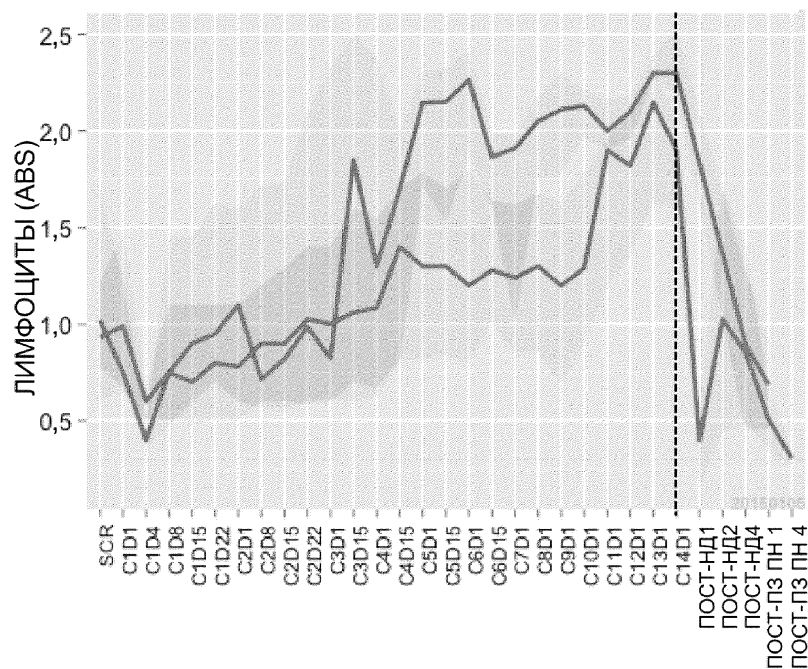
47. Способ по любому из пп.40-46, где антитело, которое специфически связывается с CD38, связывается по меньшей мере с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

48. Способ по любому из пп.40-47, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

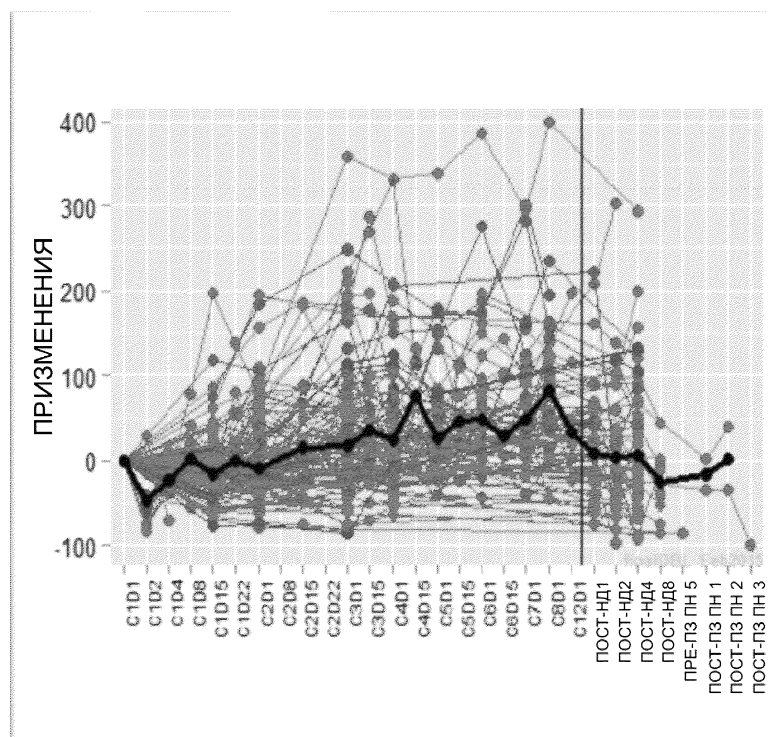
49. Способ по любому из пп.40-46, где антитело, которое специфически связывается с CD38, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

кислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

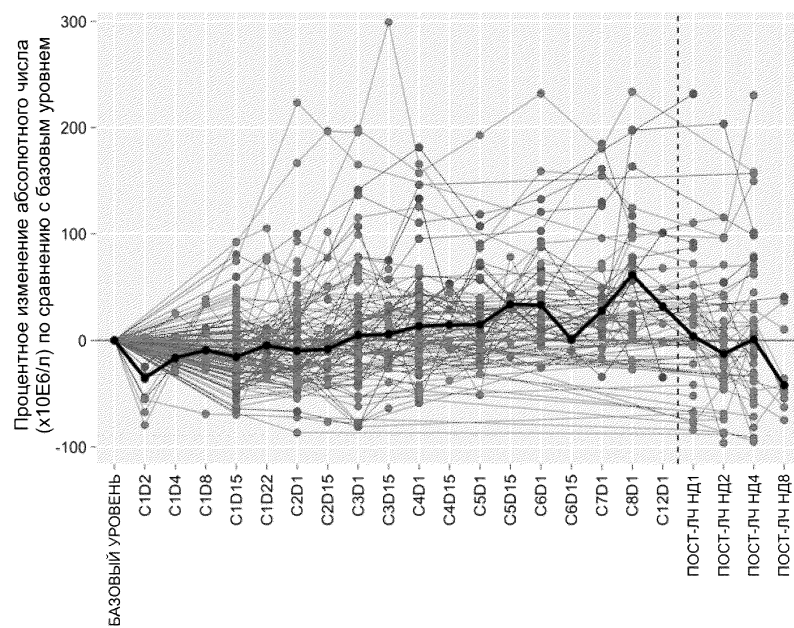
50. Способ по п.1, где пациент имеет рак или вирусную инфекцию.



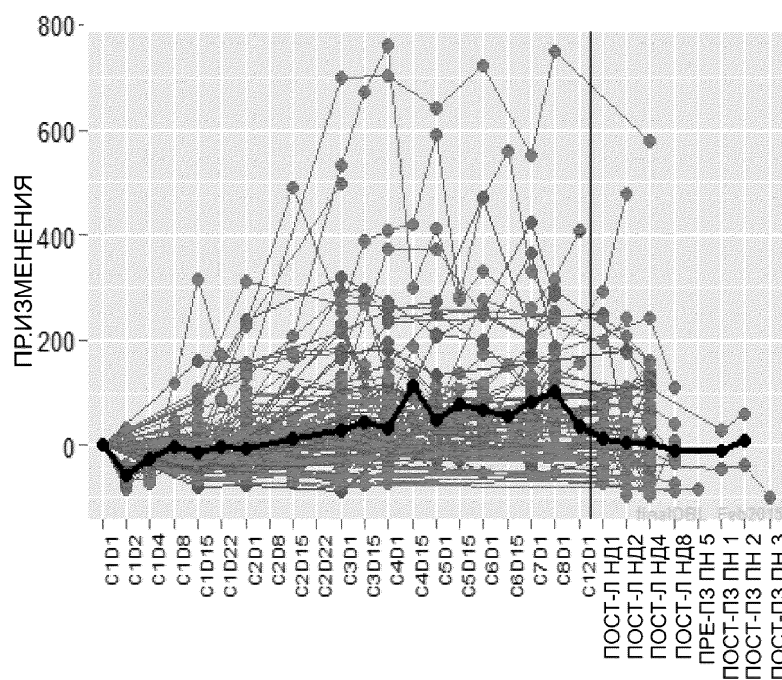
Фиг. 1



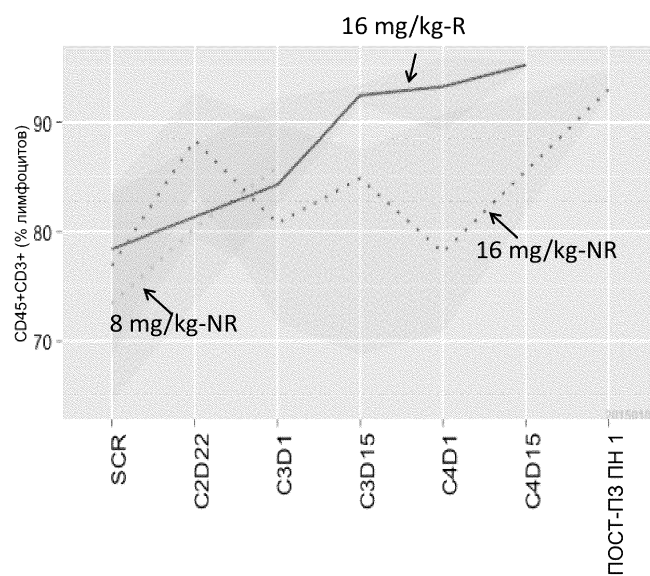
Фиг. 2



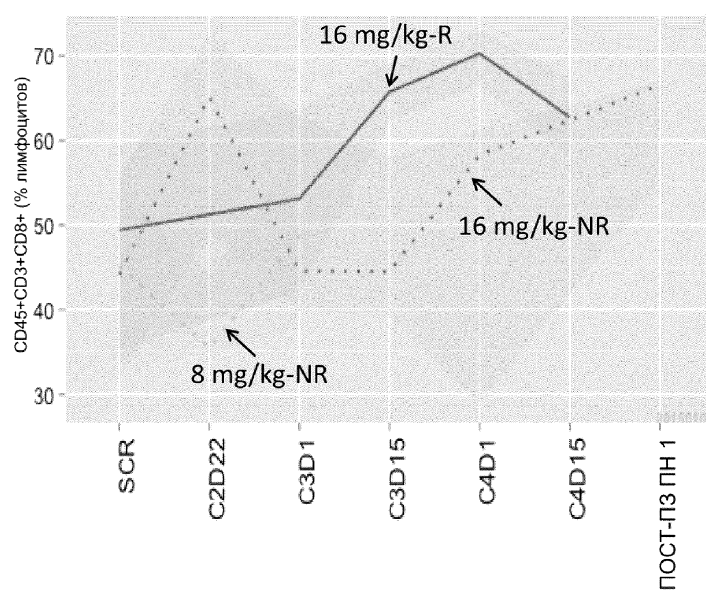
Фиг. 3



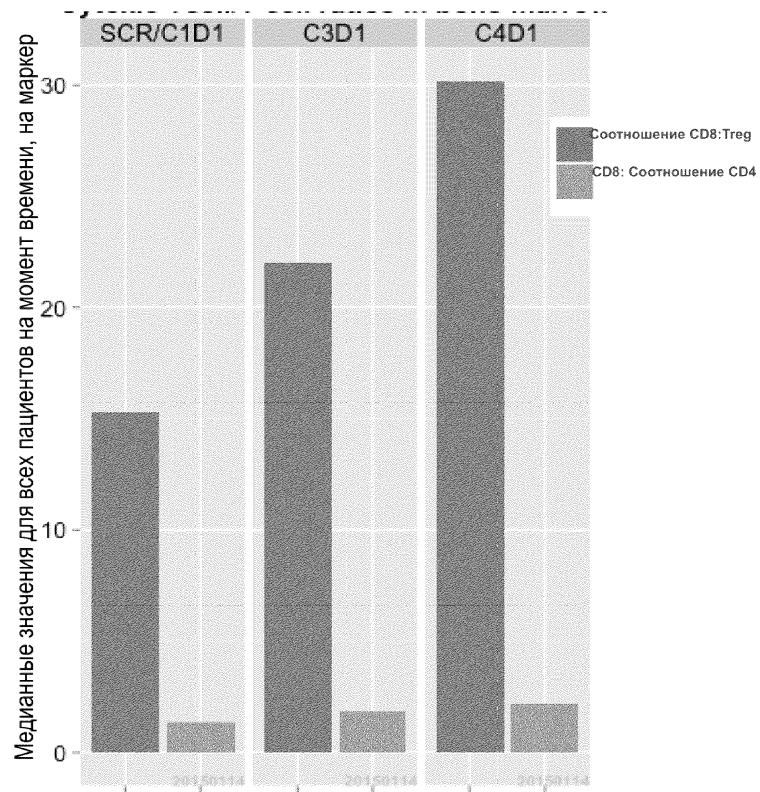
Фиг. 4



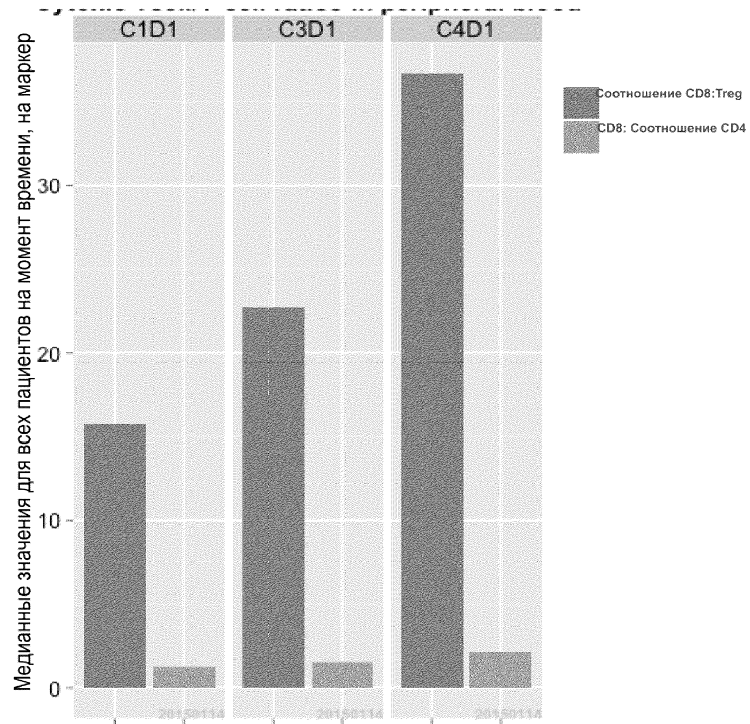
Фиг. 5



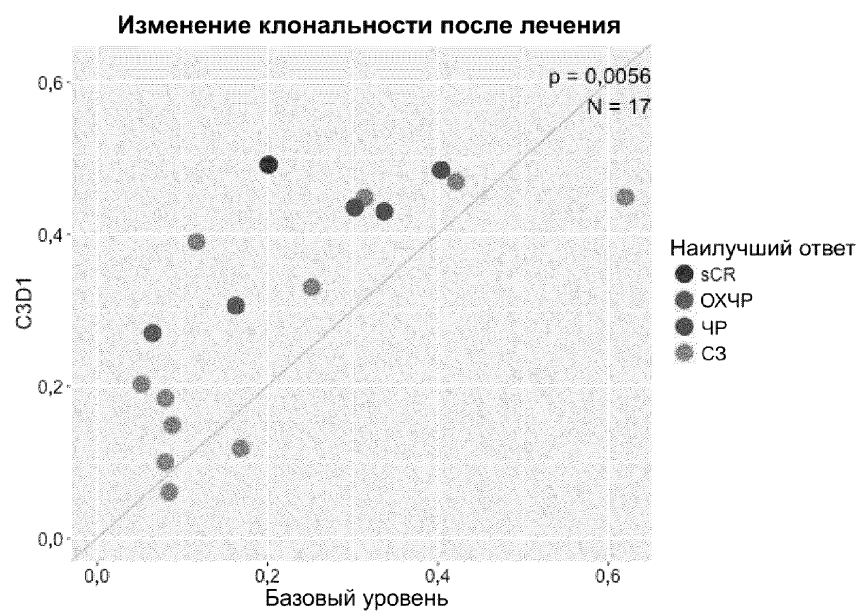
Фиг. 6



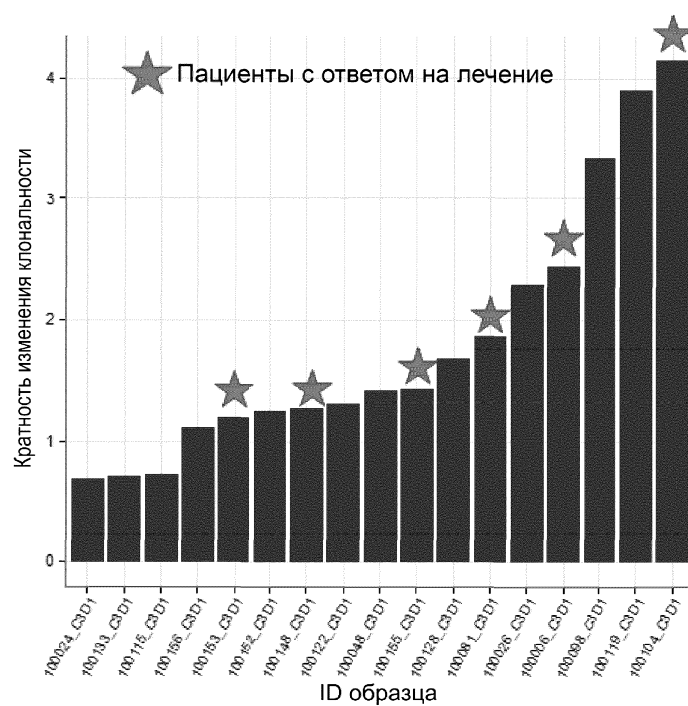
Фиг. 7А



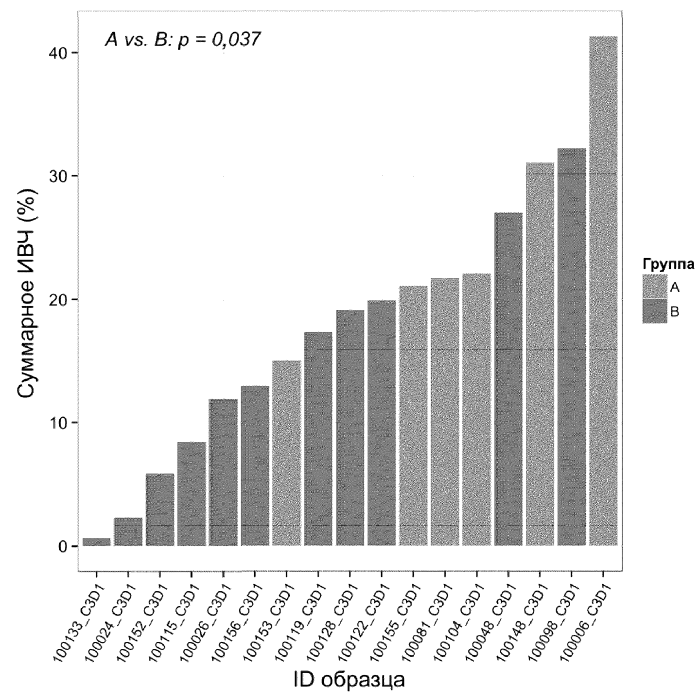
Фиг. 7В



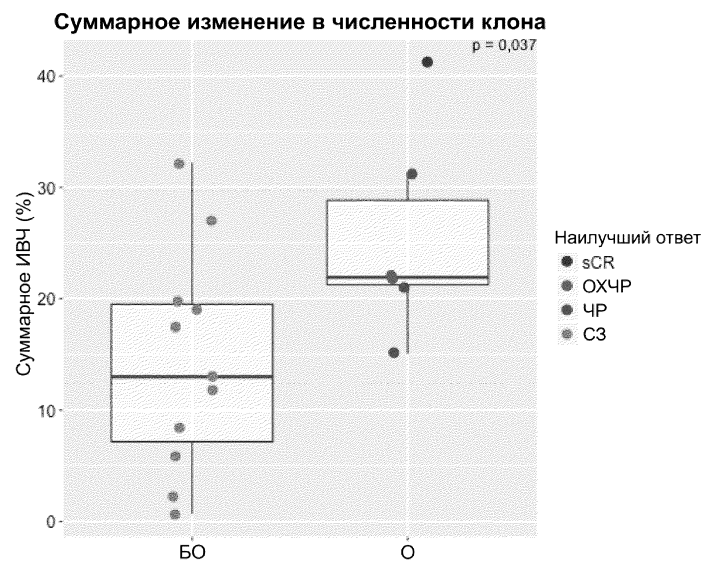
Фиг. 8А



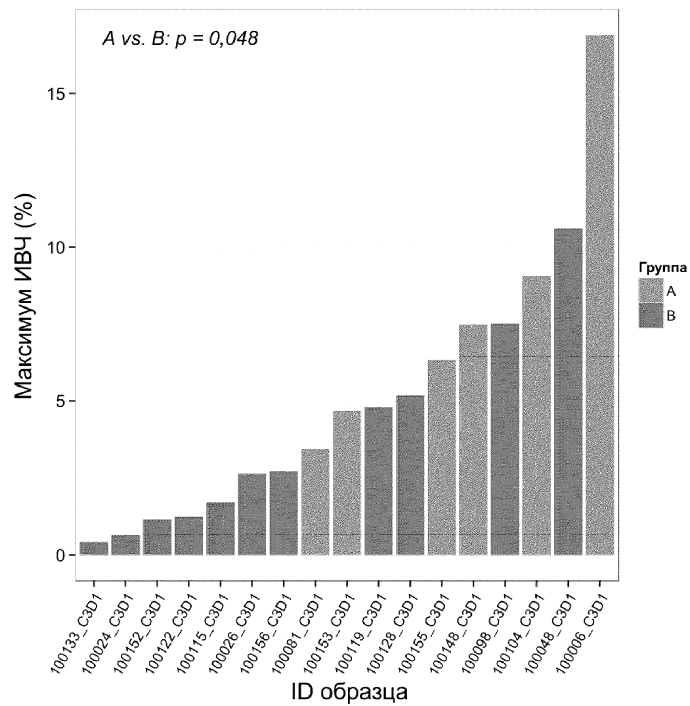
Фиг. 8В



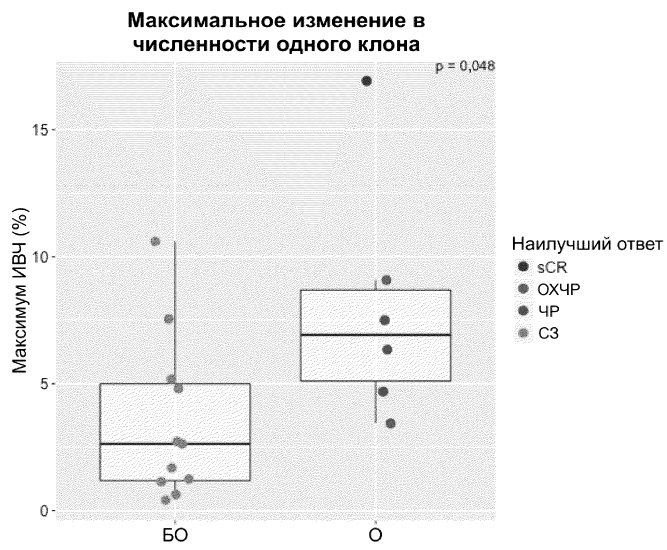
Фиг. 8С



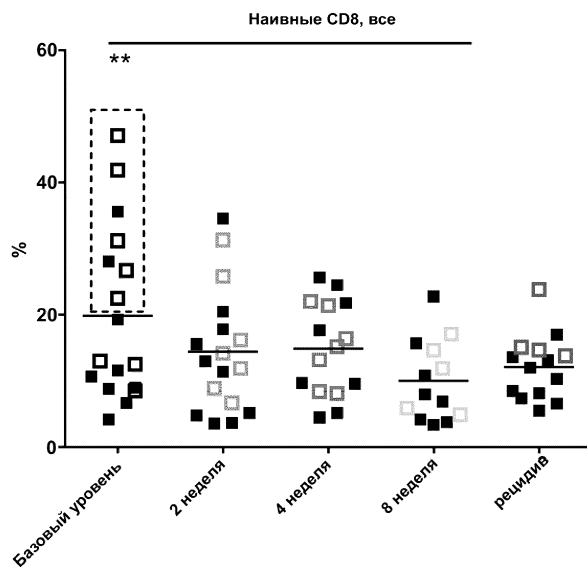
Фиг. 8D



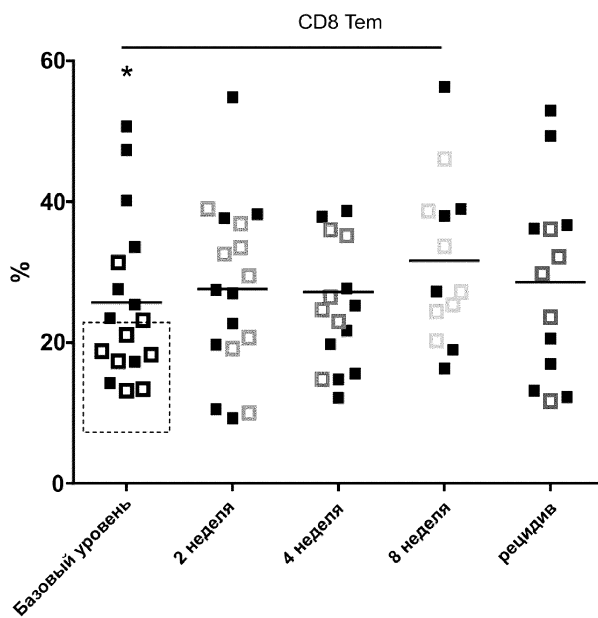
Фиг. 8Е



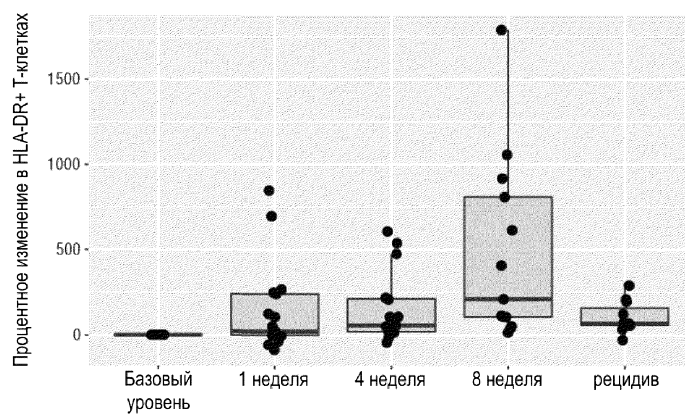
Фиг. 8F



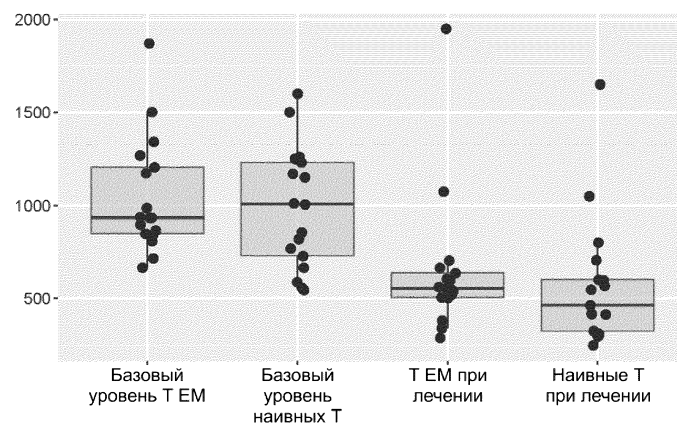
Фиг. 9А



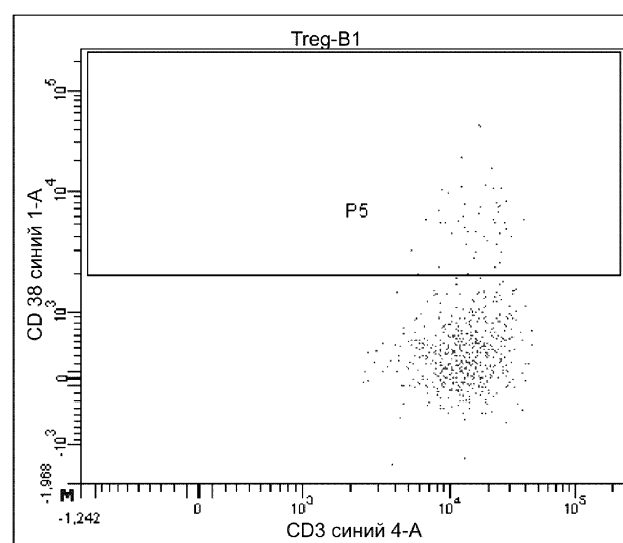
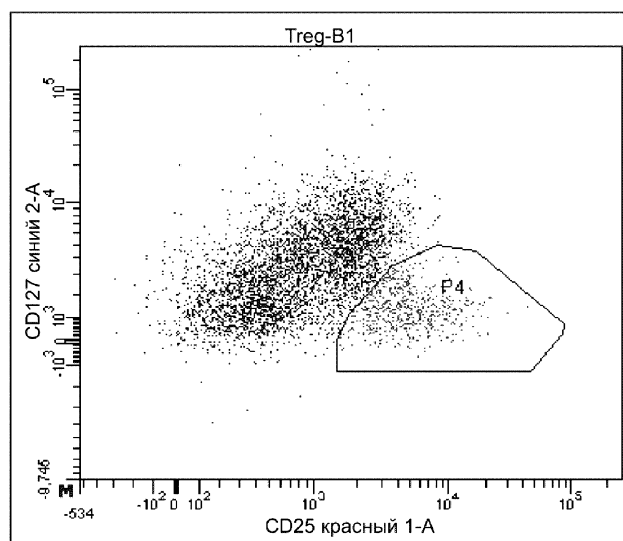
Фиг. 9В



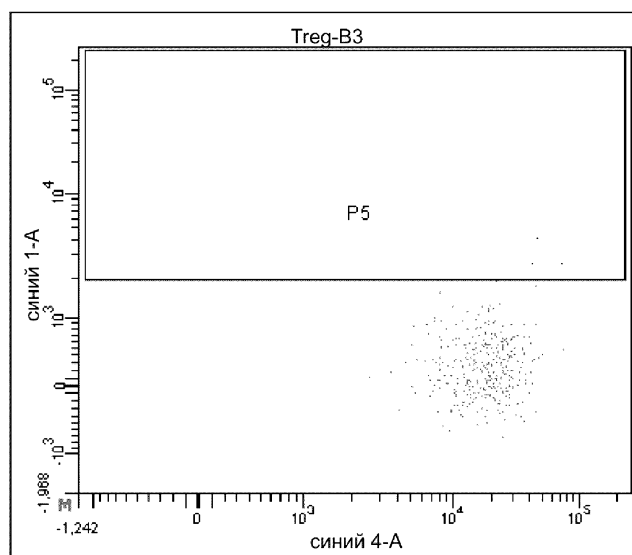
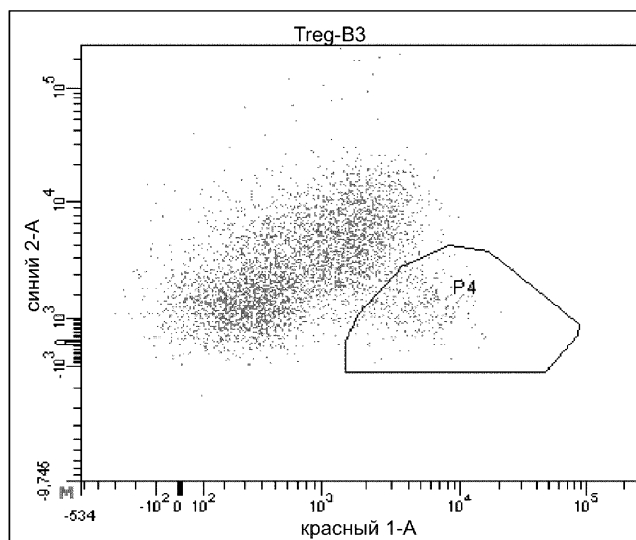
Фиг. 9С



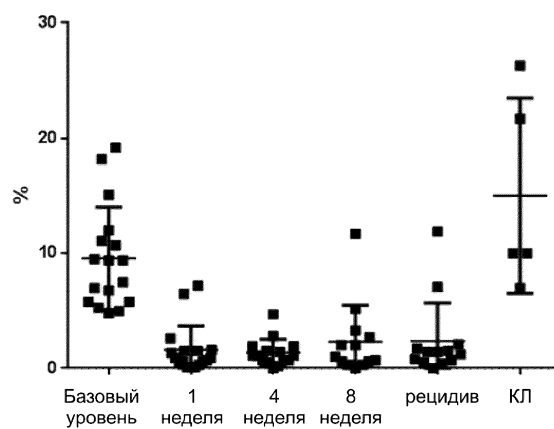
Фиг. 9D



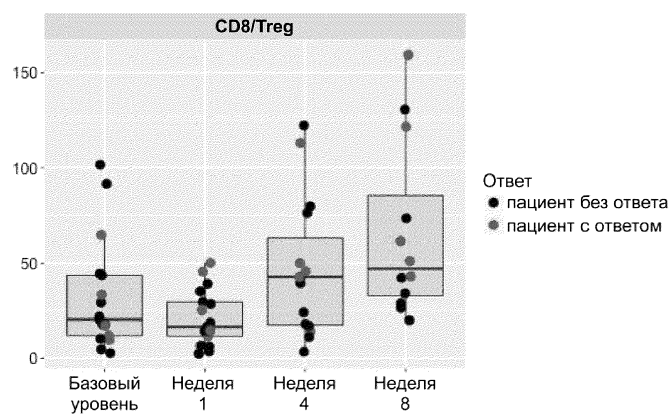
Фиг. 10А



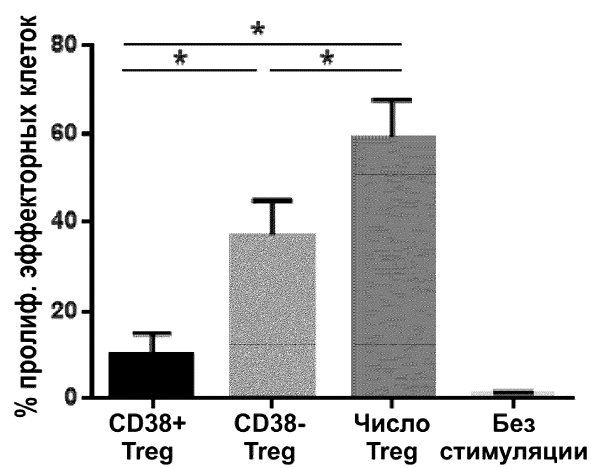
Фиг. 10В



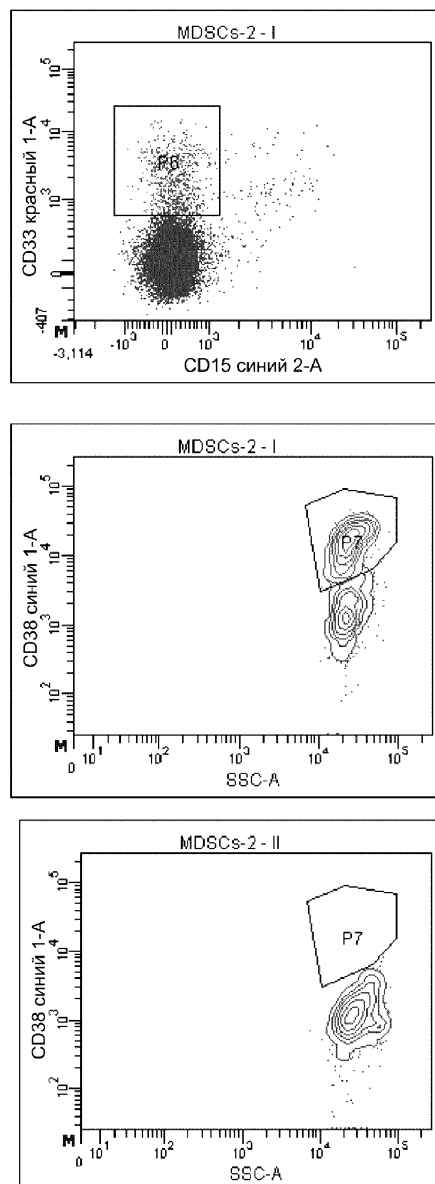
Фиг. 10С



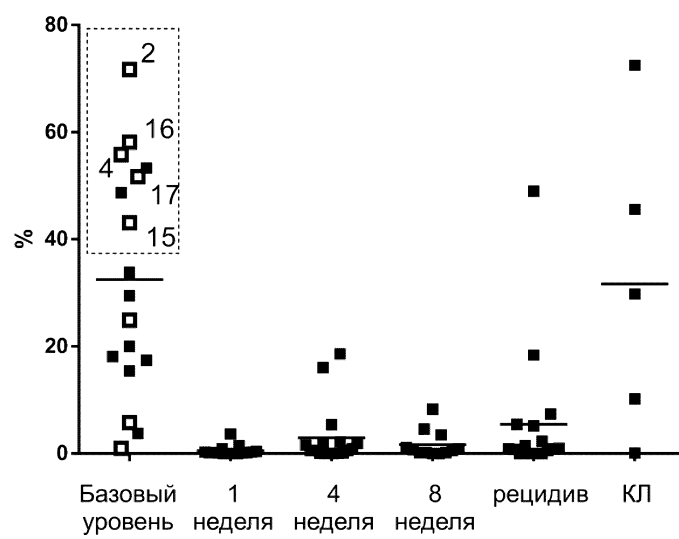
Фиг. 10D



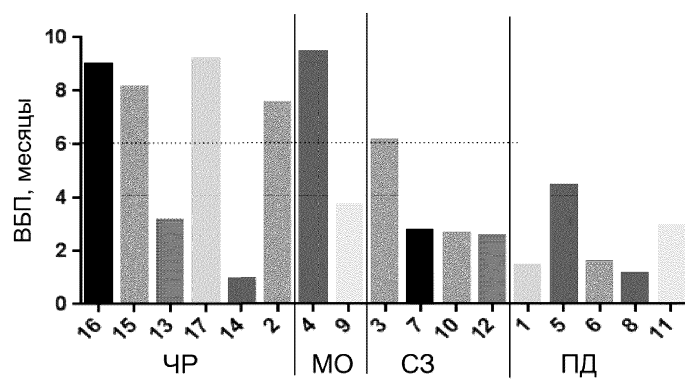
Фиг. 10E



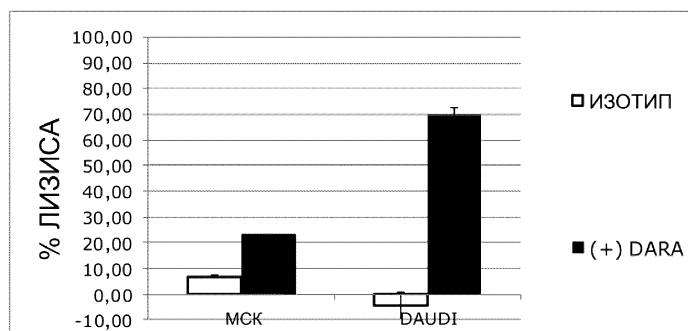
Фиг. 11



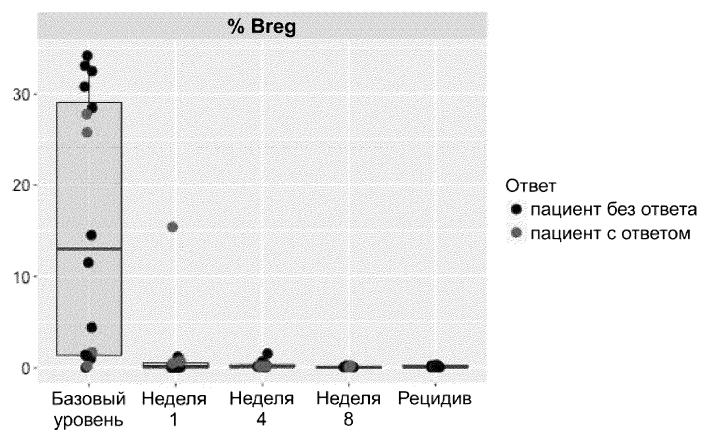
Фиг. 12



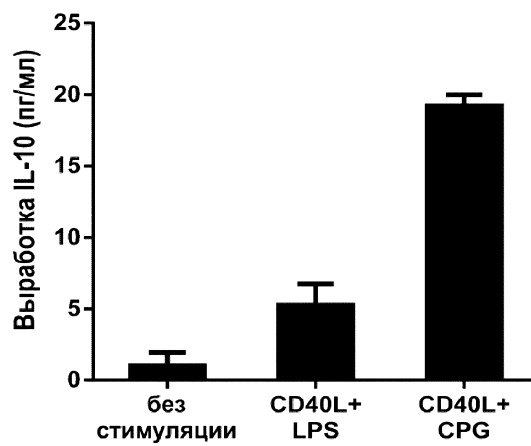
Фиг. 13



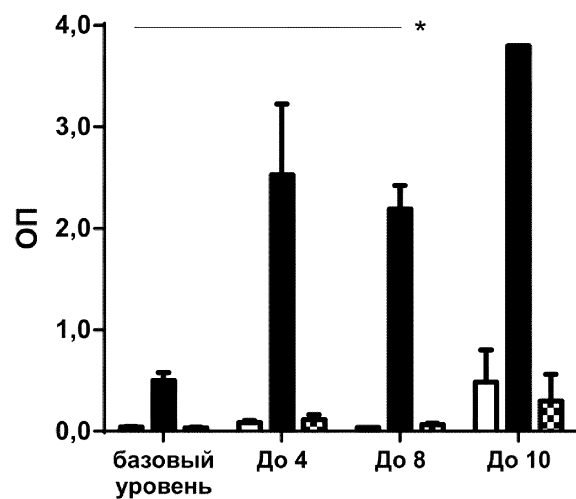
Фиг. 14



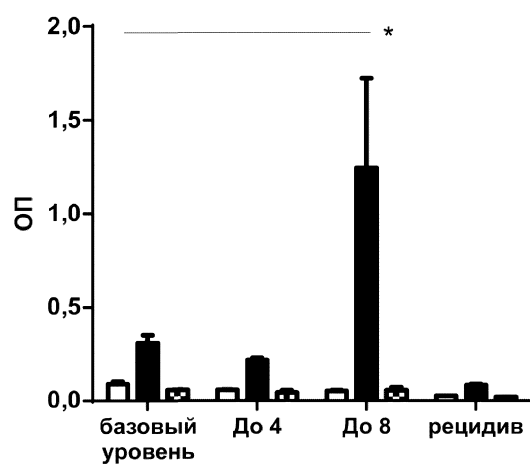
Фиг. 15А



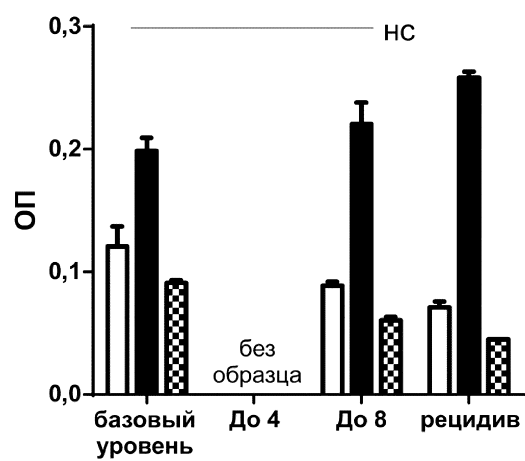
Фиг. 15В



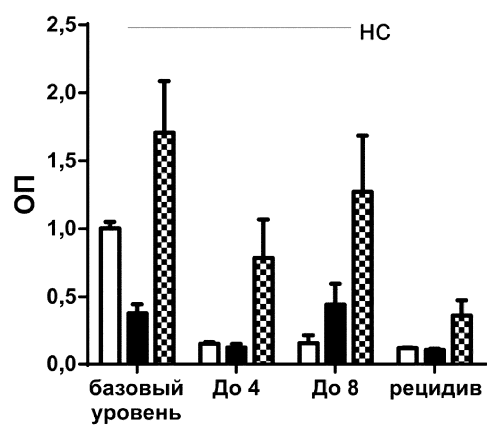
Фиг. 16А



Фиг. 16В

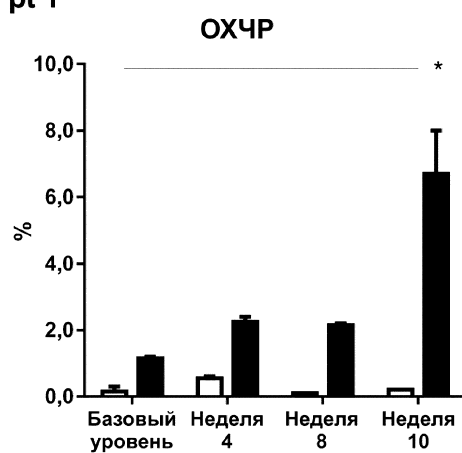


Фиг. 16С



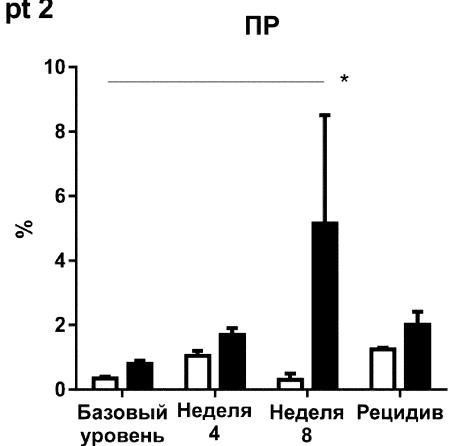
Фиг. 16D

pt 1

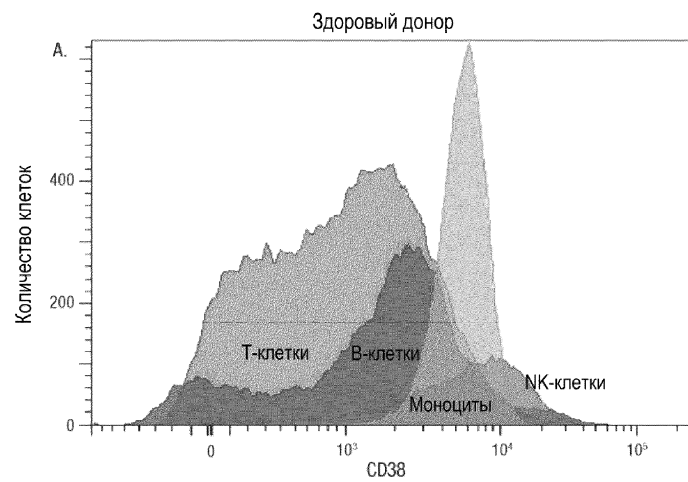


Фиг. 16E

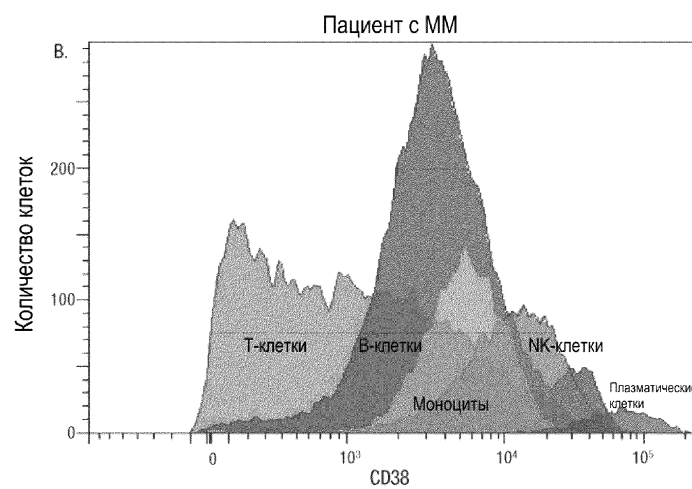
pt 2



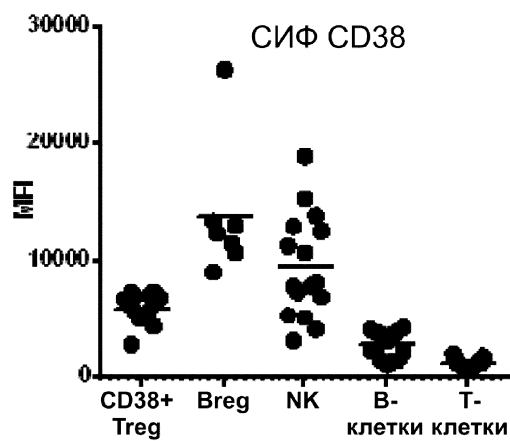
Фиг. 16F



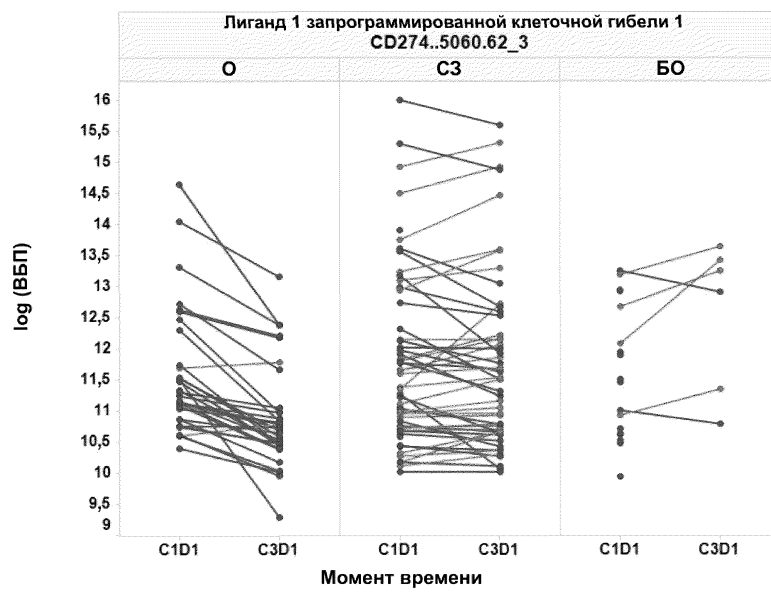
Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 17С



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2