



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124799** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 37/00

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 00631	(72) Винахідник(и):	Агмаді Тагамтан (US), Касньоф Тинекс (NL), Локгорст Генк М. (NL), Мютис Тюна (NL), Сасер Емі (US)
(22) Дата подання заявки:	24.06.2016	(73) Володілець (володільці):	ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК., 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	25.11.2021	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/184,018, 62/249,546, 62/250,566, 62/263,307, 62/331,489	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015009726 A2, 22.01.2015 WO 2012092612 A1, 05.07.2012 M. DE WEERS et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. The journal of immunology, 2010, Vol. 186, no. 3, P. 1840-1848 CHILLEMI A et al. Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the functional characteristics of the target molecule. Molecular medicine, Feinstein institute for medical research, Washington, DC; US, 2013, Vol. 19, no. 1, P. 99-108 SUZANNE L. TOPALIAN et al. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. Cancer cell, 2015, Vol. 27, no. 4, P. 450-461
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	24.06.2015, 02.11.2015, 04.11.2015, 04.12.2015, 04.05.2016		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2018, Бюл.№ 18		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	24.11.2021, Бюл.№ 47		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2016/039165, 24.06.2016		

(54) СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИТІЛА, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄ CD38

(57) Реферат:

Винахід належить до способу імуномодуляції та способу пригнічення активності імуносупресорної клітини, який включає приведення імуносупресорної клітини в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

UA 124799 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ЯКОЇ СТОСУЄТЬСЯ ВІНАХІД

Цей винахід стосується способів імунної модуляції та лікування солідних пухлин з використанням антитіл, що специфічно зв'язують CD38.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Імунна система суворо контролюється мережею костимулюючих та взаємно інгібуючих лігандів та рецепторів. Ці молекули забезпечують вторинні сигнали для активації Т-клітин і забезпечують збалансовану мережу позитивних і негативних сигналів для максимізації імунних відповідей на інфекції та пухлини, в той же час обмежуючи імунітет до самих себе (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).

Націлена на контрольні точки імунної відповіді терапія для лікування солідних пухлин, спрямована на шляхи взаємного інгібування в Т-клітинах для стимуляції протипухлинних імунних відповідей, дала можливість значно поліпшити клінічний догляд за пацієнтами, що страждають від онкологічних захворювань, завдяки застосуванню схвалених засобів, наприклад, антитіл до CTLA-4 та PD-1, що відомі під назвами EPBOЙ® (іпілімумаб іпілімумаб), KEITPYDA® (пембролізумаб) і OΠΔIBO® (ніволумаб). Антитіла до PD-1/PD-L1 демонструють покращені клінічні відповіді у пацієнтів з множинними солідними пухлинами, однак рівні відповідей все ще занижкі: приблизно 15-20 % у пацієнтів, які проходили попереднє лікування (Swaika et al., (2015) Mol Immunol doi: 10.1016 / j.molimm.2015.02.009).

Природні клітини-кілери (NK), дендритні клітини і ефекторні Т-клітини здатні запустити ефективні протипухлинні відповіді, однак пухлинні клітини часто індукують імуносупресивне мікрооточення, що сприяє розвитку імуносупресивних популяцій імунних клітин, наприклад, мієлоїдних супресорних клітин (МСК), регуляторних Т-клітин (Treg) або регуляторних В-клітин (Breg), які є причиною імунної толерантності пухлин та неефективності імунотерапевтичних схем лікування у пацієнтів з онкологічними захворюваннями та на експериментальних моделях пухлин.

Таким чином, досі актуальною є необхідність розробки нових варіантів протиракової імунотерапії, що будуть здатні індукувати адаптивну імунну відповідь на пухлини або будуть спрямовані на імуносупресивні імунні клітини.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Цей винахід пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що страждає від захворювання, опосередкованого регуляторними Т-клітинами (Treg), який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що страждає від захворювання, опосередкованого мієлоїдними супресорними клітинами (МСК), який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що страждає від захворювання, опосередкованого регуляторними В-клітинами (Breg), який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності регуляторних Т-клітин (Treg), який включає приведення клітин Treg в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності мієлоїдних супресорних клітин (МСК), який включає приведення МСК в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності регуляторних В-клітин (Breg), який включає приведення Breg в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб посилення імунної відповіді у пацієнта, який включає введення пацієнту антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає зниження числа клітин Treg у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає зниження числа мієлоїдних супресорних клітин (МСК) у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності імуносупресорної клітини, який включає приведення імуносупресорної клітини в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта з вірусною інфекцією, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

КОРОТКИЙ ОПИС РИСУНКІВ

На фіг. 1 показано, що середнє число лімфоцитів зростало з часом у пацієнтів з відповіддю на лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) в дозуванні 8 мг/кг (верхня лінія) або 16 мг/кг (нижня лінія), та що число лімфоцитів повернулося до вихідного рівня після завершення лікування. Дослідження: SIRIUS. На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 тощо). SCR: вихідний рівень; ЗЛ: закінчення лікування; ТЖ: тиждень; ПОСТ-ТЖ: після лікування в зазначені тижні; POST-PD FU: подальше спостереження після прогресування. Області, позначені різними відтінками сірого кольору, позначають 25-27 % міжквартильний розмах (MP) для точок даних кожного візиту пацієнтів з відповіддю на лікування.

На фіг. 2 показана відсоткова (%) зміна абсолютного числа Т-клітин CD3⁺ відносно вихідного рівня в периферичній крові пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), дані надані для кожного пацієнта окремо (світло-сірі лінії). Дослідження: SIRIUS (MMY2002). На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 тощо). ТЖ: тиждень; ПОСТ-ТЖ: після лікування в зазначені тижні; POST-PD FU: подальше спостереження після прогресування. Чорна лінія: медіана відсоткової зміни для всіх пацієнтів.

На фіг. 3 показана відсоткова (%) зміна абсолютного числа Т-клітин CD4⁺ відносно вихідного рівня в периферичній крові пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), дані надані для кожного пацієнта окремо (світло-сірі лінії). Дослідження: SIRIUS. На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 тощо). ТЖ: тиждень; ПОСТ-ЛКВ: після лікування. Чорна лінія: медіана відсоткової зміни для всіх пацієнтів.

На фіг. 4 показана відсоткова (%) зміна абсолютного числа Т-клітин CD8⁺ відносно вихідного рівня в периферичній крові пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), дані надані для кожного пацієнта окремо (світло-сірі лінії). Дослідження: SIRIUS. На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C1D1: цикл 1, день 1; C1D4: цикл 1, день 4 тощо). ТЖ: тиждень; PRE-PD FU: подальше спостереження до прогресування; POST-PD FU: подальше спостереження після прогресування. Чорна лінія: медіана відсоткової зміни для всіх пацієнтів.

На фіг. 5 показане підвищення з часом числа клітин CD45⁺ CD3⁺ (визначене як відсоток лімфоцитів) в аспіратах кісткового мозку під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) в дозах 8 мг/кг або 16 мг/кг. На графіку показані (та відповідно позначені) дані пацієнтів з відповіддю та пацієнтів без відповіді. Дослідження: SIRIUS. На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C2D22: цикл 2, день 22; тощо). SCR: вихідний рівень; POST-PD FU1: подальше спостереження після прогресування. Області, позначені різними відтінками сірого кольору, позначають 25-27 % міжквартильний розмах (MP) для точок даних кожного візиту не маючих відповіді на лікування пацієнтів, які отримували дозу 8 мг/кг, пацієнтів з відповіддю на лікування, які отримували дозу 16 мг/кг, або не маючих відповіді на лікування пацієнтів, які отримували дозу 16 мг/кг, відповідно. БВ: пацієнт без відповіді. ЗВ: пацієнт з відповіддю.

На фіг. 6 показане підвищення з часом числа клітин CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ (визначене як відсоток лімфоцитів) в аспіратах кісткового мозку під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) в дозах 8 мг/кг або 16 мг/кг. На графіку показані (та відповідно позначені) дані пацієнтів з відповіддю та пацієнтів без відповіді. Дослідження: SIRIUS. На осі X вказаний час у вигляді циклу лікування й днів дозування в межах кожного циклу (C2D22: цикл 2, день 22; тощо). SCR: вихідний рівень; POST-PD FU1: подальше спостереження після прогресування. Області, позначені різними відтінками сірого кольору, позначають 25-27 % міжквартильний розмах (MP) для точок даних кожного візиту не маючих відповіді на лікування пацієнтів, які отримували дозу 8 мг/кг, пацієнтів з відповіддю на лікування, які отримували дозу 16 мг/кг, або не маючих відповіді на лікування пацієнтів, які отримували дозу 16 мг/кг, відповідно. БВ: пацієнт без відповіді. ЗВ: пацієнт з відповіддю.

На фіг. 7А показане підвищення з часом співвідношення числа клітин CD8⁺/Treg та співвідношення числа клітин CD8⁺/CD4⁺ в периферичній крові, виражене у вигляді медіанних значень для всіх пацієнтів, що отримували лікування, під час прийому препарату ДАРЗАЛЕКС™

(даратумумаб). Момент часу: C1D1: цикл 1, день 1. C3D1: цикл 3, день 1. C4D1: цикл 4, день 1. Дослідження: SIRIUS. SRC: вихідний рівень.

На фіг. 7B показане підвищення з часом співвідношення числа клітин CD8⁺/Treg у аспіратах кісткового мозку, виражене у вигляді медіанних значень для всіх пацієнтів, що отримували лікування, під час прийому препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Момент часу: C1D1: цикл 1, день 1. C3D1: цикл 3, день 1. C4D1: цикл 4, день 1. Дослідження: SIRIUS.

На фіг. 8A показана підвищена клональність CD8⁺ Т-клітин у пацієнтів з відповіддю у порівнянні з пацієнтами без відповіді, визначена з використанням відсоткової зміни чисельності (ЗЧ) конкретних клональних клітин. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 8B показана кратність змін клональності CD8⁺ Т-клітин у окремих пацієнтів до і після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Маючі відповідь пацієнти помічені зірочкою. Клональність визначалась як кратність зміни чисельності (ЗЧ) окремих клональних клітин. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 8C показане підвищене загальне розширення репертуару РТК у пацієнтів з відповіддю (група А) в порівнянні з пацієнтами без відповіді (група В), визначене за ЗЧ (зміна чисельності). $P = 0,037$. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 8D показана сумарна абсолютна зміна чисельності (ЗЧ) у пацієнтів з відповіддю та пацієнтів без відповіді для кожного розмноженого Т-клітинного клону. $P = 0,035$ між пацієнтами з відповіддю (група А) й без відповіді (група В). Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 8E показана максимальна ЗЧ одного Т-клітинного клону в пацієнтів з відповіддю (група А) і пацієнтів без відповіді (група В). Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 8F показане підвищене максимальне розмноження одиничного клону пацієнтів з відповіддю (група А), в порівнянні з пацієнтами без відповіді (група В), визначене за максимальною відсотковою ЗЧ. $P = 0,0477$. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 9A показаний відсотковий вміст наївних клітин CD8⁺ у периферичній крові пацієнтів без відповіді (БВ, чорні квадрати) та пацієнтів, які показують щонайменше мінімальну відповідь (МВ, білі квадрати) на препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), на час початку прийому (вихідний рівень), через 2 тижні, 4 тижні або 8 тижнів лікування, або після рецидиву. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17. $**p=1,82 \times 10^{-4}$.

На фіг. 9B показаний відсотковий вміст наївних центральних клітин пам'яті CD8⁺ (Тem) у периферичній крові пацієнтів без відповіді (БВ, чорні квадрати) та пацієнтів, які показують щонайменше мінімальну відповідь (МВ, білі квадрати) на препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), на час початку прийому (вихідний рівень), через 2 тижні, 4 тижні або 8 тижнів лікування, або після рецидиву. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17. $*p=4,88 \times 10^{-2}$.

На фіг. 9C показане відсоткове збільшення числа CD8⁺ Т-клітин, рестрикованих HLA класу I, в периферичній крові на час початку прийому (вихідний рівень), на 1, 4 та 8 тижні лікування або після рецидиву. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 9D показані низькі рівні експресії CD38 в наївних CD8⁺ Т-клітинах і центральних клітинах пам'яті CD8⁺ (Тem) периферичної крові на час початку прийому (вихідний рівень) або під час лікування. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17. СІФ: середня інтенсивність флуоресценції.

На фіг. 10A надана гістограма аналізів FACS, на якій вказана частота появи в пацієнтів з множинною мієломою клітин Treg(CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) (верхня гістограма, популяція клітин P4) та частоту появи клітин CD38⁺ Tregs в популяції Treg (нижня гістограма, популяція клітин P5) на час початку прийому (вихідний рівень). Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 10B надана гістограма аналізів FACS, на якій вказана частота появи в пацієнтів з множинною мієломою клітин Treg(CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) (верхня гістограма, популяція клітин P4) та частоту появи клітин CD38⁺ Tregs в популяції Treg (нижня гістограма, популяція клітин P5) після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) значно знижувало кількість клітин CD38⁺ Treg. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 10C показана частота появи клітин CD38^{вис} CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg у пацієнтів, які отримували препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), на початок прийому (вихідний рівень), через 1 тиждень, 4 тижні, 8 тижнів, після рецидиву або після завершення лікування через 6 місяців (ЗЛ). Частота появи клітин CD38^{high} Treg знижувалася внаслідок лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) і поверталася на вихідний рівень на момент ЗЛ. Ось Y: відсоток клітин CD38^{вис}CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg у Т-клітинах CD3⁺. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 10D показане співвідношення клітин CD8⁺/Treg у пацієнтів з відповіддю й пацієнтів без відповіді на час початку прийому (вихідний рівень), через 1 тиждень, 4 тижні й 8 тижнів лікування. На а 8 тиждень лікування в пацієнтів з відповіддю спостерігалось значно вище співвідношення клітин CD8⁺/Treg у порівнянні з пацієнтами без відповіді ($p = 0,00955$).

5 Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 10E показане більш ефективне інгібування проліферації ефektorних клітин в присутності CD38⁺ в порівнянні з даними CD38⁻ Treg та негативним контролем. Плашки помилки позначають стандартні помилки. Зірочками позначені істотні зміни. Зразки отримували від різних здорових донорів. Аналіз проліферації клітин проводили шляхом розведення

10 сукцинімідилового естеру карбоксифлуоресцеїну (CFSE).

На фіг. 11 показана наявність мієлоїдних супресорних клітин (MCK) у пацієнтів з множинною мієломою (верхній графік, клітини в рамці) та експресія CD38 приблизно половиною клітин (середній графік, клітини в рамці). Популяція MCK CD38^{вис} була виснажена у пацієнтів, які отримували одну інфузію препарату ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб) (нижній графік, клітини в рамці).

15 Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

На фіг. 12 показане зниження числа MCK CD38^{вис}(CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺) у пацієнтів через 1 тиждень, 4 тижні або 8 тижнів лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб) в порівнянні з рівнем на час початку прийому (вихідний рівень), та його відновлення до приблизно вихідного рівня після закінчення лікування (ЗЛ). Пацієнти з рецидивом продовжували демонструвати знижене число MCK CD38^{вис}. Чорні квадрати: пацієнти без відповіді; білі квадрати: пацієнти з щонайменше мінімальною відповіддю на лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб). Вертикальні лінії: медіанні значення в кожній групі. У пацієнтів 2, 4, 15, 16 і 17 спостерігались високі вихідні популяції MCK CD38^{вис}. Дослідження: підгрупа пацієнтів GEN501 17.

25 На фіг. 13 показана найвища виживаність без прогресування (ВБП) пацієнтів з найвищим числом MCK CD38^{вис} (пацієнти 2, 4, 15, 16 і 17). Ці пацієнти демонстрували часткову (ЧВ) або мінімальну відповідь (МВ) на лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб). СЗ: стабільне захворювання; ПЗ: прогресуюче захворювання. На осі X показана ВБП кожного окремого пронумерованого пацієнта.

30 На фіг. 14 показана чутливість MCK до індукованої препаратом ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб) АЗКЦ. В якості позитивного контролю для клітин-мішеней в цьому аналізі використовували клітини Дауді. Визначали відсоток лізису клітин.

На фіг. 15А показане значне зниження кількості CD38⁺ Breg у пацієнтів, які отримували препарат ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб) на 1 тиждень, 4 тиждень і 8 тижнів лікування.

35 На фіг. 15В показана секреція IL-10 клітинами CD38⁺ Breg при стимуляції.

На фіг. 16А показана противірусна відповідь, визначена на основі вироблення інтерферону-γ, специфічного щодо ЦМВ, ВЕБ і вірусу грипу (CEF), у МКПК пацієнта, який отримував препарат ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб), з ДХЧР (дуже хороша часткова ремісія) на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. ОЦ: оптична щільність. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ; картатий стовпець: тільки алогенні МКПК. Зірочкою позначені статистично значущі зміни. Пре 4, 8, 10 = тиждень лікування 4, 8 або 10.

40 На фіг. 16В показана противірусна відповідь, визначена на основі вироблення інтерферону-γ, специфічного щодо ЦМВ, ВЕБ і вірусу грипу (CEF), у МКПК пацієнта, який отримував препарат ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб), з ПР (повна ремісія) на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. ОЦ: оптична щільність. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ; картатий стовпець: тільки алогенні МКПК. Зірочкою позначені статистично значущі зміни. Пре 4, 8, 10 = тиждень лікування 4, 8 або 10.

50 На фіг. 16С показана противірусна відповідь, визначена на основі вироблення інтерферону-γ, специфічного щодо ЦМВ, ВЕБ і вірусу грипу (CEF), у МКПК пацієнта, який отримував препарат ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб), в стані ПЗ (після захворювання) на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. ОЦ: оптична щільність. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ; картатий стовпець: тільки алогенні МКПК. НЗ: не значимо. Пре 4, 8 = тиждень лікування 4 або 8.

55 На фіг. 16D показана противірусна відповідь, визначена на основі вироблення інтерферону-γ, специфічного щодо ЦМВ, ВЕБ і вірусу грипу (CEF), у МКПК пацієнта, який отримував препарат ДАРЗАЛЕКС[™] (даратумумаб), з МВ (мінімальною відповіддю) на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. ОЦ: оптична

щільність. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ; картатий стовпець: тільки алогенні МКПК. НЗ: не значимо. Пре 4, 8 = тиждень лікування 4 або 8.

На фіг. 16Е показаний відсотковий вміст проліферуючих та реактивних щодо вірусу Т-клітин в МКПК пацієнта, що отримував препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), з ДХЧР на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ. Зірочкою позначені статистично значущі зміни. Пре 4, 8, 10 = тиждень лікування 4, 8 або 10.

На фіг. 16F показаний відсотковий вміст проліферуючих та реактивних щодо вірусу Т-клітин в МКПК пацієнта, що отримував препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), з ПР на час початку лікування (вихідний рівень) та в зазначені моменти часу протягом лікування. Білий стовпець: негативний контроль; чорний стовпець: з додаванням ЦЕГ. Зірочкою позначені статистично значущі зміни. Пре 4, 8, 10 = тиждень лікування 4, 8 або 10.

На фіг. 17А наведена гістограма аналізу FACS, що ілюструє рівні експресії CD38 на природних клітинах-кілерах (NK), моноцитах, В-клітинах і Т-клітинах здорового донора.

На фіг. 17В приведена гістограма аналізу FACS, що ілюструє рівні експресії CD38 в клітинах плазми, природних клітинах-кілерів (NK), моноцитах, В-клітинах і Т-клітинах пацієнта з множинною мієломою.

На фіг. 17С показане порівняння середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) CD38 клітин CD38+ Treg, Breg, NK, В-клітин і Т-клітин пацієнтів з рецидивною та рефрактерною множинною мієломою. Рівень експресії CD38 на В-клітинах і Т-клітинах нижчий за рівень експресії CD38 на клітинах CD38+ Treg, Breg і NK-клітинах.

На фіг. 18 показана зниження з часом регуляції білка PD-L1 в зразках МКПК пацієнтів з відповіддю (В) і підвищення з часом такої регуляції у пацієнтів без відповіді (БВ). СЗ: стабільне захворювання. С1D1: цикл 1, день 1; С3D1: цикл 3, день 1. По осі Y показаний log2 значень концентрації білка.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У цьому описі й у формулі винаходу форми однини включають у себе форми множини, крім випадків, коли контекст чітко вимагає іншого тлумачення. Таким чином, наприклад, посилання на «клітину» включає в себе комбінацію з двох або більше клітин тощо.

"CD38" відноситься до білка CD38 людини (синоніми: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФ-гідролаза 1, циклічна АДФ-рибоза-гідролаза 1). CD38 людини має амінокислотну послідовність, наведену в базі даних GenBank під номером доступу NP_001766 і в SEQ ID NO: 1. Добре відомо, що CD38 являє собою однопорохідний мембранний білок типу II, в якому амінокислотні залишки 1-21 являють цитозольний домен, амінокислотні залишки 22-42 являють трансмембранний домен, а залишки 43-300 являють позаклітинний домен CD38.

SEQ ID NO: 1

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPWRQQWSGPGTTKRFPETVL
ARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLA
HQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLAADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNPVSFVWKTVSRRFAE
AACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII
SKRNIQFSCKNIRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

У цьому документі термін "антитіла" вживається в широкому значенні й включає молекули імуноглобуліну, у тому числі моноклональні антитіла, у тому числі мишачі, людські, гуманізовані й химерні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл, біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, димерні, тетрамерні або мультимерні антитіла, одноланцюгові антитіла, домени антитіл, і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка містить сайт зв'язування з антигеном з бажаною специфічністю.

Імуноглобуліни можна віднести до п'яти основних класів, а саме IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, залежно від амінокислотної послідовності константного домену важких ланцюгів. IgA й IgG додатково поділяють на ізотипи IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Легкі ланцюги антитіл будь-якого виду хребетних тварин можна віднести до одного з двох чітко відмінних типів, а саме каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотних послідовностей їхніх константних доменів.

Термін "фрагменти антитіл" стосується частини молекули імуноглобуліну, яка зберігає антигензв'язувальний сайт важких ланцюгів і/або легких ланцюгів, наприклад областей, що визначають комплементарність, важких ланцюгів (HCDR) 1, 2 і 3, областей, що визначають комплементарність, легких ланцюгів (LCDR) 1, 2 і 3, варіабельної області важкого ланцюга (VH) або варіабельної області легкого ланцюга (VL). Фрагменти антитіла включають фрагмент Fab, одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; фрагмент F(ab)₂, двовалентний фрагмент, що містить два фрагменти Fab, зв'язаних дисульфідним містком у шарнірній ділянці; фрагмент Fd, що складається з доменів VH і CH1; фрагмент Fv, що

складається з доменів VL і VH єдиного плеча антитіла; фрагмент доменного антитіла dAb (Ward et al., Nature 341:544-6, 1989), який складається з домену VH. Домени VH та VL можуть бути сконструйовані й зв'язані один з одним за допомогою синтетичного лінкера з утворенням різних типів конструкцій одноланцюгових антитіл, в яких домени VH/VL паруються внутрішньомолекулярно або міжмолекулярно в тих випадках, коли домени VH та VL експресуються окремими конструкціями одноланцюгових антитіл з утворенням одновалентного антигензв'язуючого сайту, наприклад одноланцюговим Fv (ScFv) або діатилом. описані, наприклад, у міжнародних патентних публікаціях № WO1998/44001, WO1988/01649, WO 1994/13804 і WO 1992/01047. Ці фрагменти антитіл отримують з використанням добре відомих фахівцям у цій галузі способів, і проводять скринінг цих фрагментів на корисність у такий самий спосіб, що й для повнорозмірних антитіл.

"Виділене антитіло" означає антитіло або фрагмент антитіла, який по суті не містить інших антитіл, що мають різні антигенні властивості (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CD38, є по суті вільним від антитіл, які специфічно зв'язуються з антигенами крім CD38 людини). Однак виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CD38, може мати перехресну реактивність до інших антигенів, таких як ортологи людського CD38, наприклад CD38 *Macaca fascicularis* (яванського макака). У разі біспецифічного антитіла, таке біспецифічне антитіло специфічно зв'язується з двома досліджуваними антигенами і окрім цих двох досліджуваних антигенів, по суті, не містить антитіл, що специфічно зв'язуються з антигенами. Крім того, виділене антитіло може по суті не містити іншого клітинного матеріалу й/або хімічних речовин. Термін "виділене антитіло" включає антитіла, виділені таким чином, що вони мають більш високий ступінь чистоти, наприклад, антитіла, чисті на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %.

Термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується" або "зв'язується" стосується зв'язування антитіла з антигеном або епітопом у антигені з більшою афінністю, ніж з іншими антигенами. Зазвичай антитіло зв'язується з антигеном або епітопом у антигені з рівноважною константою дисоціації (K_D) приблизно 1×10^{-8} М або менше, наприклад, приблизно 1×10^{-9} М або менше, приблизно 1×10^{-10} М або менше, приблизно 1×10^{-11} М або менше або приблизно 1×10^{-12} М або менше, зазвичай із K_D що принаймні в сто разів менше, ніж його K_D зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, бичачим сироватковим альбуміном (BSA), казеїном). Константу дисоціації можна виміряти з використанням стандартних процедур. Однак антитіла, які специфічно зв'язуються з антигеном або епітопом у антигені, можуть мати перехресну реактивність до інших споріднених антигенів, наприклад до того самого антигена від інших видів (гомологів), таких як людина або мавпа, наприклад *Macaca fascicularis* (яванський макак, суно), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) або *Callithrix jacchus* (ігрунка звичайна, marmoset). Моноспецифічне антитіло специфічно зв'язує один антиген або один епітоп, в той час як біспецифічне антитіло специфічно зв'язує два різних антигени або два різних епітопи.

Варіабельна область антитіла складається з області "каркаса", що переривається трьома "антигензв'язувальними сайтами". Антигензв'язувальні сайти визначаються з використанням різних термінів: області, що визначають комплементарність (CDR), три у VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) і три у VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основі варіабельності послідовностей (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); "гіперваріабельні області", HVR або HV, три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3), відносяться до областей варіабельних доменів антитіл, які мають гіперваріабельну структуру за визначенням Chothia and Lesk (Chothia and Lesk (1987) Mol Biol 196:901-17). Інші терміни включають IMGT-CDR (Lefranc et al., (2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77) і "використання залишку, який визначає специфічність" (SDRU) (Almagro (2004) Mol Recognit 17:132-43). Міжнародна база даних ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) пропонує стандартизовану нумерацію й визначення антигензв'язувальних сайтів. Відповідність між визначеннями CDR, HV і IMGT описана в публікації Lefranc et al. (2003), Dev Comparat Immunol 27:55-77.

У контексті цього документа "залишки Chothia" є залишками VL і VH антитіл, пронумерованих відповідно до Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., (1997) J Mol Biol 273:927-48).

"Каркас" або "каркасні послідовності" - це інші послідовності варіабельної області, крім тих, які визначено як антигензв'язувальні сайти. Оскільки антигензв'язувальні сайти можна визначити за допомогою різних термінів, як описано вище, точна амінокислотна послідовність у каркасі залежить від того, як визначено антигензв'язувальний сайт.

"Гуманізоване антитіло" стосується антитіла, у якому антигензв'язувальні сайти отримані з видів не людського походження, а каркаси варіабельної області отримано з послідовностей

імуноглобуліну людини. Гуманізовані антитіла можуть включати заміщення в областях каркасів, так що каркас може не бути точною копією експресованого людського імуноглобуліну або генних послідовностей зародкової лінії.

5 Термін "людське антитіло" означає антитіло, що має варіабельні області важкого й легкого ланцюгів, в яких каркас і антигензв'язувальні сайти отримані з послідовностей людського походження. Якщо антитіло містить константну область, цю константну область також отримують із послідовностей людського походження.

10 Людське антитіло містить варіабельні області важкого або легкого ланцюга, які "отримані з" послідовностей людського походження, якщо варіабельні області антитіла отримують із системи, у якій використовуються гени імуноглобулінів зародкової лінії людини або перебудованих імуноглобулінів. Такі системи включають бібліотеки генів імуноглобулінів людини, продемонстровані на фагові, і трансгенних тварин не людського походження, наприклад, мишей з локусами імуноглобуліну людини. Людське антитіло може містити амінокислотні відмінності порівняно з послідовностями імуноглобуліну зародкової лінії або перебудованого імуноглобуліну внаслідок, наприклад, природних соматичних мутацій або навмисного введення заміщень у каркасні або антигензв'язуючі сайти. Зазвичай амінокислотна послідовність "людського антитіла" принаймні приблизно на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, що кодується геном імуноглобуліну зародкової лінії людини або перебудованого імуноглобуліну. У деяких випадках людське антитіло може містити консенсусні каркасні послідовності, отримані з аналізу людської каркасної послідовності, наприклад, як описано в публікації Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, або синтетичну HCDR3, введену в бібліотеки генів імуноглобулінів людини, продемонстровані на фагові, наприклад, як описано в публікації Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 і міжнародній патентній публікації № WO 2009/085462.

25 Людські антитіла, які отримують із послідовностей людського імуноглобуліну, можуть бути отримані з використанням таких систем, як фаговий дисплей, що включає синтетичні CDR і/або синтетичні каркаси, або можуть піддаватись мутагенезу *in vitro*, щоб покращити властивості антитіл, що призводить до отримання антитіл, які не існують у природі в репертуарі зародкової лінії антитіл людини *in vivo*.

Антитіла, в яких антигензв'язувальні сайти отримано з видів не людського походження, не включені у визначення терміну "людське антитіло".

35 Термін "рекомбінантне антитіло" включає всі антитіла, які отримані, експресовані, створені або виділені заснованими на рекомбінації способами, такі як антитіла, виділені з організму тварини, наприклад, миші або пацюка, що є трансгенною або трансхромосомною для генів імуноглобуліну людини, або з гібридами, отриманої від неї, що описано нижче, антитіла, виділені з клітини-хазяїна, трансформованої для експресії антитіла, антитіла, виділені з рекомбінантної комбінаторної бібліотеки антитіл, і антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які включають сплайсинг послідовностей генів імуноглобуліну людини з іншими послідовностями ДНК, або антитіла, отримані *in vitro* з використанням обміну Fab-фрагментів, наприклад біспецифічні антитіла.

40 Термін "моноклональне антитіло" відноситься до препарату молекул антитіл одномолекулярної композиції. Композиція моноклональних антитіл демонструє одну специфічність і афінність зв'язування з конкретним епітопом або, у разі біспецифічного моноклонального антитіла, подвійну специфічність зв'язування з двома різними епітопами. Таким чином, моноклональне антитіло відноситься до популяції антитіл, що складаються з єдиної амінокислоти в кожному важкому й кожному легкому ланцюзі, за винятком можливих добре відомих змін, таких як видалення з важкого ланцюга антитіла С-кінцевого лізину. Моноклональні антитіла можуть мати гетерогенне глікозилювання в популяції антитіл. 50 Моноклональне антитіло може бути моноспецифічним або мультиспецифічним або одновалентним, двовалентним або багатовалентним. Біспецифічне антитіло включене в термін "моноклональне антитіло".

Термін "епітоп" означає частину антигена, з якою специфічно зв'язується антитіло. Епітопи зазвичай складаються з хімічно активних (наприклад, полярних, неполярних і гідрофобних) 55 поверхневих скупчень функціональних груп, таких як амінокислоти або бічні ланцюги полісахаридів, і можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики зарядів. Епітоп може складатися з суміжних і/або несуміжних амінокислот, які утворюють конформаційну просторову одиницю. Для несуміжного епітопа амінокислоти з різних частин лінійної послідовності антигена опиняються в безпосередній 60 близькості в 3-вимірному просторі в результаті складання білкової молекули.

Термін "різновид" стосується поліпептиду або полінуклеотиду, який відрізняється від еталонного поліпептиду або еталонного полінуклеотиду однією або більшою кількістю модифікацій, наприклад заміщень, інсерцій або делецій.

5 "У комбінації з" означає, що описані два або більше терапевтичні засоби вводяться суб'єктові разом у вигляді суміші, одночасно у вигляді окремих агентів або послідовно у вигляді окремих агентів у будь-якому порядку. У загальному випадку кожен агент вводять в певній дозі та/або за певним режимом, визначеного для цього агента.

Терміни "лікувати", "лікування" або "терапія" стосуються терапевтичного лікування, об'єктом якого є уповільнення (зменшення) небажаної фізіологічної зміни або захворювання, як-то розвиток, розширення або поширення пухлини або пухлинних клітин, або для забезпечення корисного або бажаного клінічного результату під час лікування. Сприятливі або бажані клінічні результати включають полегшення симптомів, зменшення ступеня захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання, затримку або уповільнення прогресування захворювання, відсутність метастазів, покращення або тимчасове полегшення стану захворювання й ремісію (часткову або повну), які можна виявити або не можна виявити. «Лікування» також може означати збільшення тривалості життя у порівнянні з очікуваною тривалістю життя пацієнта за відсутності лікування. Пацієнти, які потребують лікування, включають тих, хто вже має небажану фізіологічну зміну або захворювання, а також тих, хто схильний до такої фізіологічної зміни або захворювання.

20 "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективної в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість може змінюватися залежно від таких факторів, як стан захворювання, вік, стать, маса тіла пацієнта й здатність терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів викликати бажану відповідь у індивідуума. Ілюстративні показники ефективного терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів включають, наприклад, покращення стану здоров'я пацієнта, зниження пухлинного навантаження, зупинку або уповільнення росту пухлини й/або відсутність метастазування ракових клітин у інші місця в організмі.

Термін "інгібує ріст" (наприклад, стосовно пухлинних клітин) означає вимірне зменшення або відстрочення росту пухлинних клітин або пухлинної тканини *in vitro* чи *in vivo* після контактування з терапевтичним засобом або комбінацією терапевтичних або лікарських засобів порівняно зі зменшенням або відсутністю росту тих самих пухлинних клітин або пухлинної тканини за відсутності терапевтичного агента або комбінації таких агентів. Інгібування росту пухлинних клітин або пухлинної тканини *in vitro* чи *in vivo* може становити принаймні приблизно 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 100 %.

35 Терміни "регуляторні Т-клітини" або "Treg" стосуються Т-лімфоцитів, які регулюють активність інших Т-клітин та/або інших імунних клітин, зазвичай, пригнічуючи їх активність. Клітини Tregs можуть являти собою Т-клітини CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Варто взяти до уваги, що Treg можуть бути не повністю обмежені цим фенотипом і можуть експресувати Foxp3.

40 Терміни "ефекторні Т-клітини" або "Teff" стосуються Т-лімфоцитів, які виконують функцію імунної відповіді, наприклад, знищення пухлинних клітин та/або активація протипухлинної імунної відповіді, що може призвести до позбавлення тіла пухлинних клітин. Клітини Teff можуть являти собою CD3⁺ з CD4⁺ або CD8⁺. Клітини Teff можуть секретувати, містити або експресувати маркери, наприклад, IFN- γ , гранзім В та ICOS. Варто взяти до уваги, що Teff можуть бути не повністю обмежені цим фенотипом.

45 Терміни "функція Treg" або "Treg-функція" стосуються супресивної функції Treg, що пов'язана з регуляцією імунних відповідей організму-господаря та/або запобіганням автоімунної реакції. Функцією Treg може бути пригнічення протипухлинної відповіді, викликаной Т-клітинами CD8⁺, природними клітинами-кілерами (NK), М ϕ -клітинами, В-клітинами або дендритними клітинами (ДК), або пригнічення проліферації ефекторних Т-клітин.

Вирази "пригнічує функцію Treg" або "пригнічує Treg-функцію" стосуються зниження рівня функції Treg *in vitro* або *in vivo* в організмі тварини або людини, що можна визначити з використанням традиційних способів, відомих в цій галузі. Рівень функції Treg може бути знижений, наприклад, щонайменше на приблизно 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 55 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 %. Вираз "пригнічує функцію Treg" включає зниження числа Treg, наприклад, внаслідок знищення Treg за допомогою ефекторних функцій антитіл, наприклад, антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ).

Терміни "мієлоїдні супресорні клітини" або "МСК" стосуються спеціалізованої популяції клітин гемопоетичної лінії диференціювання, які експресують макрофагальний/моноцитарний маркер CD11b і гранулоцитарний маркер Gr-1/Ly-6G. Фенотип МСК може являти собою,

наприклад, CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺. Клітини МСК характеризуються низькою або відсутньою експресією маркерів зрілих антигенпрезентуючих клітин ГКГС (головного комплексу гістосумісності) класу II і F480. Клітини МСК являють собою незрілі клітини мієлоїдної лінії диференціювання і можуть додатково диференціюватися в кілька типів клітин, включаючи макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини, моноцити або гранулоцити. Клітини МСК можуть бути природним чином наявні в нормальному дорослому кістковому мозку людини й тварин або в місцях нормального гемопоезу, наприклад, в селезінці.

Вираз "пригнічує функцію МСК" або "пригнічує функцію МСК" стосуються зниження рівня функції МСК *in vitro* або *in vivo* в організмі тварини або людини, що можна визначити з використанням традиційних способів, відомих в цій галузі. Рівень функції МСК може бути знижений, наприклад, щонайменше на приблизно 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 %. Вираз "пригнічує функцію МСК" включає зниження числа МСК, наприклад, внаслідок знищення МСК за допомогою ефекторних функцій антитіл, наприклад, АЗКЦ. Клітини МСК можуть пригнічувати Т-клітинні відповіді, наприклад, проліферацію, клональне розмноження або вироблення цитокінів, за допомогою різних механізмів, наприклад, вироблення активних форм кисню, пероксинітритів, підвищення метаболізму аргінази внаслідок високих рівнів аргінази і підвищення рівня синтази оксиду азоту. Клітини МСК можуть демонструвати відповідь на IFN- γ і деякі цитокіни, наприклад, IL-4 і IL-13. IFN- γ може активувати МСК, що індукує активність синтази оксиду азоту 2 (NOS2). В альтернативному варіанті цитокіни Th2, наприклад, інтерлейкін-4 (IL-4) і IL-13, можуть активувати МСК, що може викликати індукцію активності аргінази-1 (ARG1). Метаболізм L-аргініну, який здійснюється через NOS2 або ARG1, може призводити до пригнічення проліферації Т-клітин, а активність обох ферментів разом може викликати апоптоз Т-клітин завдяки виробленню реактивних молекул оксиду азоту.

Термін "пов'язане з Treg захворювання" стосується захворювання або порушення, пов'язаного з регуляторними Т-клітинами (Treg). Пов'язане з Treg захворювання може бути викликане певною функцією Treg, наприклад, пригніченням протипухлинної відповіді або пригніченням проліферації ефекторних Т-клітин. Опосередковане Treg захворювання може являти собою онкологічне захворювання. Вирази "пов'язане з Treg захворювання" і "опосередковане Treg захворювання" вживаються в цьому документі взаємозамінно.

Вирази "підвищувати відповідь ефекторних Т-клітин" або "підвищувати відповіді Т-клітин" стосуються підвищення або стимуляції ефекторних Т-клітин *in vitro* або *in vivo* в організмі тварини або людини для провокування подовження або посилення біологічної функції, або для оновлення або реактивації виснажених або неактивних Т-клітин. Типовими Т-клітинними відповідями є проліферація, секреція γ -інтерферону Т-клітинами CD8⁺, отримання відповіді на антиген або клональне розмноження. Спосіб визначення цього підвищення відомий фахівцям в цій галузі.

Термін "пов'язане з МСК захворювання" стосується захворювання або порушення, пов'язаного з мієлоїдними супресорними клітинами (МСК). Пов'язане з МСК захворювання може бути викликане функцією МСК, наприклад, пригніченням протипухлинної відповіді або проліферації ефекторних Т-клітин. Опосередковане МСК захворювання може являти собою онкологічне захворювання. Вирази "пов'язане з МСК захворювання" і "опосередковане МСК захворювання" вживаються в цьому документі взаємозамінно.

Терміни "регуляторні В-клітини" або "Breg" стосуються В-лімфоцитів, які пригнічують імунні відповіді. Клітини Breg можуть являти собою клітини CD19⁺CD24⁺CD38⁺ і можуть пригнічувати імунні відповіді шляхом пригнічення проліферації Т-клітин, опосередкованої IL-10, що секретується Breg. Варто взяти до уваги, що існують інші підгрупи Breg, які описані, наприклад, в Ding et al., (2015) Human Immunology 76: 615-621.

Термін "пов'язане з Breg захворювання" стосується захворювання або порушення, пов'язаного з регуляторними В-клітинами. Пов'язане з Breg захворювання може бути викликане, наприклад, опосередкованим Breg пригніченням протипухлинної відповіді або проліферацією ефекторних Т-клітин. Опосередковане Breg захворювання може являти собою онкологічне захворювання. Вирази "пов'язане з Breg захворювання" і "опосередковане Breg захворювання" вживаються в цьому документі взаємозамінно.

Термін "пацієнт" включає будь-кого з людини або тварини, що не є людиною. Термін "тварина, що не є людиною" включає всіх хребетних тварин, наприклад, ссавців і тварин, що не є ссавцями, як-от приматів, що не є людиною, овець, собак, кішок, коней, корів, курей, земноводних тварин, плазунів тощо. Терміни "пацієнт" і "суб'єкт" використовуються в цьому документі взаємозамінно.

У винаході запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, за допомогою антитіла, яке специфічно зв'язує CD38 незалежно від того, експресують пухлинні клітини CD38, чи ні. У винаході додатково запропоновані способи лікування пацієнта, що страждає на захворювання, опосередковане регуляторними Т-клітинами (Treg), мієлоїдними супресорними клітинами (МСК) або регуляторними В-клітинами (Breg). У винаході додатково запропоновані способи модуляції активності Treg, МСК або Breg для лікування CD38-позитивних солідних пухлин та/або солідних пухлин, пов'язаних з високими рівнями таких імунносупресорних клітин.

Винахід щонайменше частково ґрунтується на відкритті того, що антитіло до CD38 ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) виявляє імуномодулюючу активність в організмі пацієнтів, знижує число імуносупресорних Treg, МСК і Breg, підвищує число CD8⁺ Т-клітин і співвідношення між клітинами CD8⁺ і Treg, стимулює утворення центральних клітин пам'яті CD8⁺ і підвищує клональність Т-клітин.

В цей час препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) та інші антитіла до CD38 проходять клінічну оцінку ефективності лікування гемових злоякісних новоутворень і порушень плазматичних клітин, включаючи множинну мієлому, внаслідок здатності антитіла знищувати CD38-позитивні клітини за допомогою ефекторних функцій антитіла, наприклад, АЗКЦ, КЗЦ, АЗКФ і апоптоза. Не була виявлена імуномодулююча активність таких антитіл, направлена на стимуляцію адаптивних імунних відповідей. Функції інших імуномодулюючих антитіл (антитіло до PD1 та до CTLA4) виконуються через націлювання на компоненти імунної системи, які пригнічують протипухлинні відповіді. Наприклад, була виявлена здатність антитіла до PD1 підвищувати проліферацію Т-клітин, стимулювати антигенспецифічні відповіді імунологічної пам'яті та частково знижувати опосередковану Treg супресію ефекторних Т-клітин in vitro (наприклад, див. патент США № 8,779,105). В цей час для лікування меланоми схвалені два антитіла до PD-1, ОПДИВО® (ніволумаб) і КЕЙТРУДА® (пембролізумаб), які знаходяться на стадії клінічної розробки для лікування різних солідних пухлин, наприклад, недрібноклітинного раку легень, раку простати, голови, шиї, шлунково-кишкового тракту, шлунку, простати, фалопієвих труб, яєчників, підшлункової залози, молочної залози, головного мозку, нирок, сечового міхура, уретри й стравоходу, а також колоректального раку. Антитіло до CTLA-4 ЕРВОЙ® (іпіліумаб) було схвалено для лікування меланоми. Також на стадії розробки знаходяться ЕРВОЙ® (іпіліумаб) та інше антитіло до CTLA-4, тремеліумаб, призначені для лікування раку простати, недрібноклітинного раку легень, раку яєчника, шлунково-кишкового тракту, шлунку, колоректального раку, раку нирок і стравоходу, а також урогенітального раку.

Не бажаючи обмежуватись будь-якою конкретною теорією та на основі імуномодулюючої дії, що спостерігалася при використанні описаного в даному препараті ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) та інші антитіла до CD38 можуть виявитися ефективними в лікуванні солідних пухлин. Внаслідок загальної активації імунної відповіді, що спостерігається у пацієнтів, що отримували препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), у пацієнтів, що мають CD38-негативні солідні пухлини, також може проявлятися відповідь на терапію антитілами до CD38.

У винаході запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, спосіб включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має опосередковане регуляторними Т-клітинами (Treg) захворювання, спосіб включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для лікування опосередкованого Treg захворювання.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має опосередковане мієлоїдними супресорними клітинами (МСК) захворювання, спосіб включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для лікування опосередкованого МСК захворювання.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має опосередковане регуляторними В-клітинами (Treg) захворювання, спосіб включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для лікування опосередкованого Breg захворювання.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності регуляторних Т-клітин (Treg), що включає приведення регуляторних Т-клітин в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності мієлоїдних супресорних клітин (МСК), що включає приведення МСК в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб пригнічення активності регуляторних В-клітин (Breg), що включає приведення Breg в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

5 У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає зниження числа регуляторних Т-клітин (Treg) у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає зниження числа мієлоїдних супресорних клітин (МСК) у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

10 У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає зниження числа регуляторних В-клітин (Breg) у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

У винаході також запропонований спосіб підвищення імунної відповіді у пацієнта, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для підвищення імунної відповіді.

У деяких варіантах втілення пацієнт має вірусну інфекцію.

У винаході також запропонований спосіб лікування вірусної інфекції у пацієнта, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, протягом часу, достатнього для лікування вірусної інфекції.

20 У деяких варіантах здійснення імунна відповідь являє собою відповідь, опосередковану ефекторними Т-клітинами (Teff).

У деяких варіантах здійснення відповідь Teff опосередкована CD4⁺ Т-клітинами або CD8⁺ Т-клітинами.

25 У деяких варіантах здійснення відповідь Teff опосередкована CD4⁺ Т-клітинами.

У деяких варіантах здійснення відповідь Teff опосередкована CD8⁺ Т-клітинами.

У деяких варіантах здійснення відповідь Teff полягає в підвищенні числа CD8⁺ Т-клітин, підвищенні проліферації CD8⁺ Т-клітин, підвищенні клонального розмноження Т-клітин, підвищенні утворення клітин пам'яті CD8⁺, підвищенні антигензалежного вироблення антитіл або підвищенні вироблення цитокінів, хемокінів або інтерлейкінів.

Проліферацію Т-клітин можна оцінити, наприклад, шляхом визначення швидкості синтезу ДНК із застосуванням обробленого тритієм тимідину або шляхом визначення вироблення інтерферону-γ (IFN-γ) in vitro, або шляхом визначення абсолютного числа або відсоткового вмісту Т-клітин в популяції клітин із зразків пацієнта із застосуванням відомих способів.

35 Клональне розмноження можна оцінити, наприклад, шляхом секвенування РТК з пулу Т-клітин із застосуванням відомих способів.

Утворення клітин пам'яті можна оцінити, наприклад, шляхом визначення співвідношення кількості наївних Т-клітин (CD45RO⁻/CD62L⁺) до кількості Т-клітин пам'яті (CD45RO⁺/CD62L^{high}), наприклад, з проведенням аналізу FACS.

40 Вироблення цитокінів, хемокінів або інтерлейкінів, наприклад, вироблення інтерферону-γ (IFN-γ), фактору некрозу пухлин-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 і IL-23, MIP-1α, MIP-1β, RANTES та CCL4, можна оцінити, використовуючи стандартні способи, такі як аналіз ІФА або ELLISPOT.

Вироблення антигенспецифічних антитіл можна оцінити в отриманих від пацієнта зразках, використовуючи стандартні способи, такі як аналіз ІФА або радіоімунаналіз (RIA).

45 Значення термінів "підвищувати" або "підвищення" різних відповідей Teff легко зрозуміло. Підвищення в досліджуваному зразку або у суб'єкта може становити щонайменше приблизно 5 %, щонайменше приблизно 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 % або більше в порівнянні з контролем, наприклад, у пацієнта, який отримувал лікування антитілом до CD38, в порівнянні з тим самим пацієнтом до лікування, або у пацієнта або групи пацієнтів, що відповідають на лікування антитілом до CD38, в порівнянні з пацієнтом або групою пацієнтів, що не показують відповіді на таке саме лікування. Зазвичай підвищення є статистично значущим.

55 Аналогічно, значення "знижувати" або "зниження" або "зменшувати" або "зменшення" числа Treg, МСК та/або Breg легко зрозуміло. Зниження в досліджуваному зразку або у суб'єкта може становити щонайменше приблизно 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 % або більше в порівнянні з контролем, наприклад, у пацієнта, який отримувал лікування антитілом до CD38, в порівнянні з тим самим пацієнтом до лікування, або у пацієнта або групи пацієнтів, що відповідають на лікування антитілом до CD38, в порівнянні з пацієнтом або групою пацієнтів, що не показують відповіді на таке саме лікування. Зазвичай зниження є статистично значущим.

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 % або більше в порівнянні з контролем, наприклад, у пацієнта, який отримував лікування антитілом до CD38, в порівнянні з тим самим пацієнтом до лікування, або у пацієнта або групи пацієнтів, що відповідають на лікування антитілом до CD38, в порівнянні з пацієнтом або групою пацієнтів, що не показують відповіді на таке саме лікування. Зазвичай зниження є статистично значущим.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, пригнічує функцію імуносупресорних клітин.

У деяких варіантах здійснення імуносупресорними клітинами є регуляторні Т-клітини (Treg), міелоїдні супресорні клітини (МСК) або регуляторні В-клітини (Breg).

У деяких варіантах здійснення Treg являють собою Т-клітини CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}.

У деяких варіантах здійснення клітини CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} експресують Foxp3.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} експресують CD38.

Функцію Treg, наприклад, їхню здатність пригнічувати клітини Teff, можна оцінити відомими способами, наприклад, шляхом оцінки здатності Treg пригнічувати проліферацію Teff в реакції змішаних лімфоцитів (РЗЛ).

Функцію Treg можна пригнічувати, наприклад, шляхом зниження відносної кількості Treg в порівнянні з Teff (наприклад, підвищення співвідношення клітин CD8⁺/Treg) за допомогою прямого знищення клітин або субпопуляції Treg, наприклад, клітини CD38⁺ Treg.

У деяких варіантах здійснення функція Treg знижується через знищення клітин Treg.

У деяких варіантах здійснення знищення Treg опосередковано індукованою антитілом антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ), антитілозалежним клітинним фагоцитозом (АЗКФ), комплементзалежною цитотоксичністю (КЗЦ) або апоптозом, індукованим антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У деяких варіантах здійснення знищення Treg опосередковано АЗКЦ.

У деяких варіантах здійснення відбувається знищення клітин CD38⁺ Treg.

У деяких варіантах здійснення відбувається знищення 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 % або 60 % клітин Treg.

CD38 експресується тільки в частині Treg і МСК, тож очікується, що лікування пацієнтів з солідними пухлинами не приведе до системного виснаження Treg і МСК, що, скоріш за все, сприятиме поліпшенню профілю безпеки.

У деяких варіантах здійснення клітини МСК є клітинами CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺.

У деяких варіантах здійснення клітини МСК CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺ експресують CD38.

Функцію МСК можна пригнічувати, наприклад, шляхом зниження числа МСК за допомогою прямого знищення клітин.

У деяких варіантах здійснення функція МСК знижується через знищення CD38⁺ МСК.

У деяких варіантах здійснення знищення МСК опосередковано індукованою антитілом антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ), антитілозалежним клітинним фагоцитозом (АЗКФ), комплементзалежною цитотоксичністю (КЗЦ) або апоптозом, індукованим антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У деяких варіантах здійснення знищення МСК опосередковано АЗКЦ.

У деяких варіантах здійснення відбувається знищення 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 % або 60 % клітин МСК.

У деяких варіантах здійснення Breg являють собою клітини CD19⁺CD24⁺CD38⁺.

Функцію Breg можна пригнічувати, наприклад, шляхом зниження числа Breg за допомогою прямого знищення клітин Breg.

У деяких варіантах здійснення функція Breg знижується через знищення CD38⁺ Breg.

У деяких варіантах здійснення знищення Breg опосередковано індукованою антитілом антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ), антитілозалежним клітинним фагоцитозом (АЗКФ), комплементзалежною цитотоксичністю (КЗЦ) або апоптозом, індукованим антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

У деяких варіантах здійснення знищення Breg опосередковано АЗКЦ.

У деяких варіантах здійснення відбувається знищення 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 % або 60 % клітин Treg.

Клітини Treg відіграють важливу роль в підтримці периферичної автотолерантності. Клітини CD4⁺CD25^{hi} Tregs природного походження виробляються в тимусі і експресують транскрипційний фактор Foxp3, необхідний для встановлення і підтримки ідентичності лінії диференціювання Treg та їхньої супресорної функції. Клітини Treg можуть накопичуватися на місці захворювання (наприклад, в пухлині), де вони пригнічують ефекторну функцію специфічних до пухлинних антигенів Т-клітин, що призводить до отримання недостатніх протипухлинних відповідей. Підвищена щільність інфільтруючих пухлину клітин Foxp3⁺ Treg пов'язана з несприятливим прогнозом при ряді різних солідних пухлин, включаючи рак підшлункової залози, яєчника і гепатоклітинну карциному. Виснаження Treg призводить до підвищення протипухлинної імунної відповіді і відторгнення пухлин на мишачих моделях, але також може призводити до розвитку аутоімунних захворювань.

Мієлоїдні супресорні клітини (МСК) є гетерогенною популяцією ранніх клітин-попередників мієлоїдних клітин, незрілих гранулоцитів, макрофагів і дендритних клітин на різних стадіях диференціювання. Вони накопичуються в великих кількостях у пацієнтів з онкологічними захворюваннями і мають сильні імуносупресивні функції, пригнічуючи цитотоксичну активність природних клітин-кілерів (NK) і природних Т-клітин-кілерів (NKT), а також адаптивну імунну відповідь, опосередковану CD8⁺ Т-клітинами. Механізм інгібування NK-клітин на даний момент не повністю зрозумілий, проте відомо декілька шляхів опосередкованої МСК супресії Т-клітин, включаючи вироблення аргінази 1/ARG1 та підвищення регуляції синтази оксиду азоту 2 (NOS2). ARG1 і NOS2 метаболізують L-аргінін і разом або окремо блокують трансляцію CD3δзета-ланцюга Т-клітин, а також інгібують проліферацію Т-клітин і стимулюють апоптоз Т-клітин. Крім того, МСК секретують імуносупресивні цитокіни й індують розвиток регуляторних Т-клітин.

Клітини МСК індуються прозапальними цитокінами й виявляються в підвищених кількостях при інфекційних і запальних патологічних станах. Вони накопичуються в крові, кістковому мозку й вторинних лімфоїдних органах мишей-носіїв пухлин та їхня присутність в пухлинному мікрооточенні, імовірно, є причиною стимуляції пухлиноасоційованої імунної супресії.

Клітини МСК, як було описано, виявлялись у пацієнтів, що страждали від раку товстої кишки, меланоми, гепатоцелюлярної карциноми, плоскоклітинної карциноми голови та шиї, недрібноклітинного раку легень, нирковоклітинної карциномою, аденокарциноми підшлункової залози й раку молочної залози (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 Biol Ther 9: 331-339; Diaz-Montero et al., (2009) Cancer Immunol Immunother 58: 49-59; Corzo et al., (2009) J Immunol 182: 5693-5701). У пацієнтів з онкологічними захворюваннями, Diaz et al. (Diaz-Montero et al., (2009) Cancer Immunol Immunother 58: 49-59) припускали, що накопичення МСК корелює з пізнішою стадією захворювання і несприятливим прогнозом.

Інфільтруючі пухлину клітини Treg були виявлені в солідних пухлинах, також клітини Treg можуть стимулювати ріст і метастазування пухлини, що опосередковується різними механізмами, наприклад, пригніченням протипухлинної активності CD8⁺ Т-клітин і NK-клітин, як описано, наприклад, в Ding et al., (2015) Human Immunology 76:615–62.

"Антитілозалежна клітинна цитотоксичність", "антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність" або "АЗКЦ" є механізмом індукції загибелі клітин, який залежить від взаємодії покритих антитілами клітин-мішеней з ефекторними клітинами, які мають літичну активність, такими як природні клітини-кілери, моноцити, макрофаги й нейтрофіли, через Fc-гамма-рецептори (FcγR), що експресуються на ефекторних клітинах. Наприклад, NK-клітини експресують рецептор FcγRIIIa, тоді як моноцити експресують рецептори FcγRI, FcγRII і FcγRIIIa. Загибель покритої антитілами клітини-мішені, наприклад клітин, що експресують CD38, відбувається в результаті активності ефекторних клітин внаслідок секреції мембранних пороформувальних білків і протеаз. Для оцінки активності АЗКЦ антитіла, що специфічно зв'язує CD38, антитіло можна додавати до клітин, що експресують CD38, у комбінації з імунними ефекторними клітинами, які можуть бути активовані комплексами антиген-антитіло, що призводить до цитолізу клітини-мішені. Зазвичай цитоліз виявляють за вивільненням із лізованих клітин мітки (наприклад, радіоактивних субстратів, флуоресцентних барвників або природних внутрішньоклітинних білків). Приклади ефекторних клітин для таких аналізів

включають моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і ПК-клітини. Типові клітини-мішені включають клітини Treg або MCK, які експресують CD38. В ілюстративному аналізі клітини-мішені мітять 20 мкКі ^{51}Cr протягом 2 годин і ретельно промивають. Концентрацію клітин-мішеней можна доводити до 1×10^6 клітин/мл і додавати різні концентрації антитіл до CD38. Аналізи починають додаванням клітин-мішеней у співвідношенні ефektorні клітини:клітини-мішені 40:1. Після інкубації протягом 3 год. при температурі 37 °C аналізи зупиняють шляхом центрифугування, та вимірюють у сцинтиляційному лічильнику вивільнення ^{51}Cr із лізованих клітин. Відсоток клітинної цитотоксичності можна розрахувати як % максимального лізису, який можна індукувати додаванням 3 % хлорної кислоти до клітин-мішеней.

"Антитілозалежний клітинний фагоцитоз" (АЗКФ) відноситься до механізму видалення покритих антитілами клітин-мішеней шляхом поглинання фагоцитарними клітинами, такими як макрофаги або дендритні клітини. АЗКФ можна оцінити, використовуючи в якості клітин-мішеней, сконструйованих з можливістю експресії ЗФБ (зелений фотоактивованій білок) або інших мічених молекул, клітини Treg або MCK, які експресують CD38. Співвідношення ефektorні клітини : клітини-мішені може становити, наприклад, 4 : 1. Ефektorні клітини можна інкубувати з клітинами-мішенями протягом 4 годин з антитілом до CD38 або без нього. Після інкубації клітини можна відокремити з використанням акутази. Макрофаги можуть бути ідентифіковані з використанням антитіл до CD11b і CD14, зв'язаних із флуоресцентною міткою, а відсоток фагоцитозу можна визначати на основі % флуоресценції GFP у макрофагах CD11⁺CD14⁺ з використанням стандартних способів.

"Комплементзалежна цитотоксичність" або "КЗЦ" відноситься до механізму індукції загибелі клітин, у якому Fc-ефektorний домен антитіла, зв'язаного з мішенню, зв'язується з компонентом C1q комплементу й активує його, що, у свою чергу, активує каскад комплементу, призводячи до загибелі клітини-мішені. Активація комплементу може також призвести до відкладення компонентів комплементу на поверхні клітини-мішені, що полегшує АЗКЦ шляхом зв'язування рецепторів комплементу (наприклад, CR3) на лейкоцитах.

Здатність моноклональних антитіл індукувати АЗКЦ може бути підвищена шляхом конструювання їхнього олігосахаридного компонента. IgG1 або IgG3 людини є N-глікозилізованими на Asn297 з більшістю гліканів у добре відомих біантенарних формах G0, G0F, G1, G1F, G2 або G2F. Антитіла, отримані за допомогою несконструйованих клітин CHO, як правило, мають вміст фукози гліканів приблизно принаймні 85 %. Видалення корової фукози з олігосахаридів типу біантенарних комплексів, приєднаних до Fc-областей, підвищує АЗКЦ антитіл через покращення зв'язування FcγR1IIa без впливу на зв'язування антигена або активність КЗЦ. Такі МАТ можна отримати з використанням різних способів, описаних як такі, що призводять до успішної експресії антитіл з відносно високим рівнем дефукозилування, які несуть Fc-олігосахариди типу біантенарного комплексу, наприклад контролю осмоляльності культури (Konno et al., (2012) Cytotechnology 64:249-65), застосування різновиду Lec13 клітинної лінії CHO як клітинної лінії-хазяїна (Shields et al., (2002) J Biol Chem 277:26733-26740), застосування варіанта EB66 клітинної лінії CHO як клітинної лінії-хазяїна (Olivier et al., (2010) MAbs 2(4); електронна публікація до виходу з друку; PMID:20562582), застосування гібридомної клітинної лінії пацюків YB2/0 як клітинної лінії-хазяїна (Shinkawa et al., (2003) J Biol Chem 278:3466-3473), введення малих інтерферуючих РНК, зокрема проти гена α 1,6-фукозилтрансферази (FUT8) (Mori et al., (2004) Biotechnol Bioeng 88:901-908) або коекспресії β-1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III і α-манозидази II або ефективного інгібітора альфа-манозидази I кіфунезину (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, викликану антитілами до CD38, які використовуються в способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення, можна посилювати шляхом певних заміщень у Fc-фрагментах антитіл. Прикладами заміщень є, наприклад, заміщення в позиціях амінокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 або 430 (нумерація залишків відповідає індексу EU), як описано в патенті США № 6,737,056.

У деяких варіантах втілення антитіло, що специфічно зв'язує CD38, містить заміщення в області Fc антитіла.

У деяких варіантах втілення антитіло, що специфічно зв'язує CD38, містить заміщення в області Fc антитіла в позиціях амінокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 або 430 (нумерація залишків відповідає індексу EU).

У деяких варіантах втілення антитіло, що специфічно зв'язує CD38, має біантенарну гліканову структуру з вмістом фукози від приблизно 0 % до приблизно 15 %, наприклад 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % або 0 %.

У деяких варіантах втілення антитіло, що специфічно зв'язує CD38, має біантенарну гліканову структуру з вмістом фукози приблизно 50 %, 40 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % або 0 %

Заміщення в області Fc і зниження вмісту фукози можуть підвищувати активність АЗКЦ антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

"Вміст фукози" означає кількість моносахариду фукози в ланцюзі цукрів у Asn297. Відносна кількість фукози являє собою відсоток фукозовмісних структур, пов'язаних з усіма глікоструктурами. Її можна охарактеризувати й визначити кількісно декількома способами, наприклад: 1) з використанням часопролітної матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI-TOF) зразків, оброблених N-глікозидазою F (наприклад, комплексних, гібридних і оліго-й високоманозних структур), як описано в міжнародній патентній публікації № WO 2008/077546; 2) шляхом ферментативного вивільнення гліканів Asn297 із подальшою дериватизацією й виявленням/кількісним визначенням за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) або надпродуктивної рідинної хроматографії (НПРХ) з флуоресцентною детекцією й/або ВЕРХ-МС (НПРХ-МС); 3) аналізом інтактних білків нативних або ослаблених mAb з обробкою або без обробки гліканів Asn297 ферментом Endo S або іншим ферментом, що розщепляє зв'язок між першим і другим моносахаридами GlcNAc, залишаючи фукозу прикріпленою до першого GlcNAc; 4) розщепленням mAb на складові пептиди за допомогою ферментативного розщеплення (наприклад, трипсином або ендопептидазою Lys-C) і наступним розділенням, виявленням і кількісним визначенням за допомогою ВЕРХ-МС (НПРХ-МС); або 5) відділенням олігосахаридів mAb від білка mAb за допомогою специфічного ферментативного деглікозилювання з використанням PNGase F на Asn 297. Олігосахариди, вивільнені в такий спосіб, можуть бути мічені флуорофором, розділені й ідентифіковані з використанням різних взаємодоповнюючих способів, які забезпечують: точну характеристику гліканових структур за допомогою матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI) мас-спектрометрії шляхом порівняння експериментальних мас з теоретичними масами, визначення ступеня сіалювання шляхом іонообмінної ВЕРХ (GlycoSep C), розділення й кількісного визначення форм олігосахаридів згідно з критеріями гідрофільності за допомогою нормофазної ВЕРХ (GlycoSep N) і розділення й кількісного визначення олігосахаридів способом високоефективного капілярного електрофорезу з лазерно-індукованою флуоресценцією (HPCE-LIF).

В цьому документі терміни "низький рівень фукози" або "низький вміст фукози" стосується антитіл з вмістом фукози в діапазоні приблизно 0-15 %.

У контексті цього документа "нормальний рівень фукози" або "нормальний вміст фукози" стосується антитіл з вмістом фукози приблизно вище 50 %, як правило, приблизно вище 60 %, 70 %, 80 % або вище 85 %.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, може індукувати знищення клітин Treg, MCK та/або Breg допомогою апоптозу. Способи оцінки апоптозу добре відомі й включають, наприклад, забарвлення аннексином IV з використанням стандартних способів. Антитіла до CD38, які використовуються в способах винаходу, можуть індукувати апоптоз у приблизно 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 100 % клітин.

У деяких варіантах здійснення клітини Teff або імуносупресорні клітини знаходяться в кістковому мозку або в периферичній крові.

У деяких варіантах здійснення клітини Teff або імуносупресорні клітини знаходяться в кістковому мозку.

У деяких варіантах здійснення клітини Teff або імуносупресорні клітини знаходяться в периферичній крові.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, підвищує співвідношення між CD8⁺ Т-клітинами та клітинами Treg.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, підвищує співвідношення між центральними клітинами пам'яті CD8⁺ і наївними клітинами CD8⁺. Центральні клітини пам'яті CD8⁺ можуть бути визначені як клітини CD45RO⁺/CD62L^{вис}. Наївні клітини CD8⁺ можуть бути визначені як клітини CD45RO⁻/CD62L⁺.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, є неагоністичним антитілом.

Неагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, стосується антитіла, яке після зв'язування з CD38 не індукує значну проліферацію зразка моноклеарних клітин периферичної крові in vitro в порівнянні з проліферацією, індукованою ізотипічним контрольним антитілом або чистим середовищем.

У деяких варіантах здійснення неагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, індукує проліферацію мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) статистично незначним чином. Проліферацію МКПК можна оцінити шляхом виділення МКПК здорових донорів і культивування клітин в кількості 1×10^5 клітин на ямку в плоскодонних 96-ямкових планшетах у присутності та за відсутності досліджуваного антитіла в 200 мкл RPMI. Через чотири дні інкубації при 37 °C можна додати 30 мкл 3H-тимідину (16,7 мкКі/мл) і продовжити культивування протягом ночі. Включення 3H-тимідину можна оцінити з використанням гамма-лічильника Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, CT, США) відповідно до інструкцій виробника. Дані можуть бути розраховані як середнє число відліків в хвилину (γ СПС) для МКПК, отриманих від декількох донорів. Статистичну значимість або незначимість різниці між зразками, культивованими в присутності або за відсутності досліджуваного антитіла, розраховують стандартними способами.

Прикладом антитіла до CD38, яке можна використовувати в способах цього винаходу є DARZALEX™ (даратумумаб). Препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) містить амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) та варіабельної області легкого ланцюга (VL), показані в SEQ ID NO: 4 і 5 відповідно, послідовності області, що визначає комплементарність, важкого ланцюга 1 (HCDR1), HCDR2 та HCDR3 із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно, та послідовності області, що визначає комплементарність, легкого ланцюга 1 (LCDR1), LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно, і належить до підтипу IgG1/κ і описаний у патенті США № 7,829,693. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга препарату DARZALEX™ (даратумумаб) продемонстрована в SEQ ID NO: 12, а амінокислотна послідовність легкого ланцюга продемонстрована в SEQ ID NO: 13.

У деяких варіантах втілення антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, конкурує за зв'язування з CD38 з антитілом, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.

У деяких варіантах втілення антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, зв'язується принаймні з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO: 1

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRACLGLVSVILVLILVVVLAVVVPWRQWWSGPGTTKRFPETVL
ARCVKYTEIHPMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLA
HQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAE
AACDVVHVMLNGSRKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSDRLCQDPTIKELESII
SKRNIQFSCKNYRDPKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVPFDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEVPFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVPFDYWGQGLTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS

LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 Антитіла можна оцінювати щодо їхньої конкуренції з референтним антитілом, наприклад, з препаратом DARZALEX™ (даратумумаб), що має VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, за зв'язування з CD38 з використанням відомих способів *in vitro*. В ілюстративному способі клітини CHO, які рекомбінантно експресують CD38, можна інкубувати з неміченим еталонним антитілом протягом 15 хв. при температурі 4 °C із подальшою інкубацією з надлишком флуоресцентно-міченого досліджуваного антитіла протягом 45 хв. при температурі 4 °C. Після промивання у фосфатно-сольовому буферному розчині з бичачим сироватковим альбуміном (ФСБ/БСА) флуоресценцію можна виміряти за допомогою проточної цитометрії з використанням стандартних способів. В іншому ілюстративному способі позаклітинну частину людського CD38 можна нанести як покриття на планшет для аналізу ELISA. Протягом приблизно 15 хвилин можна додавати надлишок неміченого еталонного антитіла, після чого можна додати біотинільовані досліджувані антитіла. Після промивання у ФСБ/твіні зв'язування досліджуваних біотинільованих антитіл можна виявити з використанням стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP), і провести детекцію сигналу з використанням стандартних способів. Цілком очевидно, що в конкурентних аналізах еталонне антитіло може бути міченим, а досліджуване антитіло - неміченим. Досліджуване антитіло конкурує з еталонним антитілом, якщо еталонне антитіло інгібує зв'язування досліджуваного антитіла або якщо досліджуване антитіло інгібує зв'язування еталонного антитіла з CD38 принаймні на 80 %, наприклад на 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %. Епітоп досліджуваного антитіла можна визначити додатково, наприклад, шляхом пептидного картування або аналізів захисту від обміну водню/дейтерію з використанням відомих способів або шляхом визначення кристалічної структури.

20 Антитіла, що зв'язуються з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1) можуть бути отримані, наприклад, шляхом імунізації мишей пептидами, які мають амінокислотні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 2 і 3 з використанням стандартних способів, як описано в цьому документі, і отримані антитіла можна охарактеризувати щодо зв'язування з пептидами з використанням, наприклад, аналізу ІФА або досліджень мутагенезу.

30 У винаході також запропонований спосіб лікування пацієнта, який має солідну пухлину, що включає введення пацієнтові, який цього потребує, антитіла до CD38, яке зв'язується з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). Епітоп антитіла, що використовується в способі за цим винаходом, включає в себе деякі або всі залишки, що мають послідовності, показані в SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах втілення епітоп антитіла містить принаймні одну амінокислоту в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні одну амінокислоту в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах втілення епітоп антитіла містить принаймні дві амінокислоти в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні дві амінокислоти в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах втілення епітоп антитіла містить принаймні три амінокислоти в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні три амінокислоти в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1).

40 У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 9, 10 та 11 відповідно.

55 У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 і 11 відповідно.

60 У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить VH, яка на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 4, та VL, яка на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 5.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить важкий ланцюг із SEQ ID NO: 12 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 13.

5 Іншими прикладами антитіл до CD38, які застосовні відповідно до способів втілення цього винаходу, є:

mAb003, що містить послідовності VH та VL із SEQ ID NO: 14 і 15 відповідно й описане в патенті США № 7,829,693. VH і VL mAb003 можуть експресуватися як IgG1/к.

SEQ ID NO: 14

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIANSQAQK
FQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSED TAVYYCARDIAALGPFDYWGQGT LTVTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFGSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK;

15 mAb024, що містить послідовності VH та VL із SEQ ID №№: 16 і 17 відповідно, описане в патенті США № 7,829,693. VH і VL mAb024 можуть експресуватися як IgG1/к.

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPHDSDARYSPSF
QGQVTFADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVSS

20 SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEP

EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK;

25 MOR-202 (MBP-03087), що містить послідовності VH та VL із SEQ ID NO: 18 і 19 відповідно, описане в патенті США № 8,088,896. VH і VL MOR-202 можуть експресуватися як IgG1/к.

SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 19

30 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSN
SGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTG GASLVFGGGT KLTVLGQ;

Ізатуксимаб, що містить послідовності VH та VL із SEQ ID NO: 20 і 21 відповідно, описане в патенті США № 8,153,765. VH і VL ізатуксимабу можуть експресуватися як IgG1/к.

SEQ ID NO: 20

35 QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQ
KFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYGSNSLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 21:

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGS
GAGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQHQHSPPYTFGGGT KLEIK

40 Інші приклади антитіл до CD38, які можна використовувати у способах винаходу, описані в міжнародній патентній публікації № WO 05/103083, міжнародній патентній публікації № WO 06/125640, міжнародній патентній публікації № WO 07/042309, міжнародній патентній публікації № WO 08/047242 або міжнародній патентній публікації № WO 14/178820.

45 Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 14 та VL із SEQ ID NO: 15, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 16 та VL із SEQ ID NO: 17, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

55 Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 18 та VL із SEQ ID NO: 19 протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 20 та VL із SEQ ID NO: 21 протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

- 5 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою меланому.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак легень.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою плоскоклітинний недрібноклітинний рак легень (НДКРЛ).
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою неплазмоклітинний НДКРЛ.
- 10 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою аденокарциному легень.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою нирково-клітинну карциному (НKK) (наприклад, світлоклітинну ниркову карциному або папілярну ниркову карциному) або її метастатичні ураження.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою мезотеліому.
- 15 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою носоглоткову карциному (НГK).
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою колоректальний рак.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак простати або кастраційно-резистентний рак простати.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак шлунка.
- 20 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак яєчника.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак ШКТ.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак печінки.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак підшлункової залози.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак щитовидної залози.
- 25 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою плоскоклітинну карциному голови і шиї.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою карциноми стравоходу і шлунково-кишкового тракту.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак молочної залози.
- 30 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак фалопієвих труб.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак головного мозку.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак уретри.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою уrogenітальний рак.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою ендометріоз.
- 35 У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою рак шийки матки.
У деяких варіантах здійснення солідна пухлина являє собою метастатичні ураження при онкологічних захворюваннях.
У деяких варіантах здійснення в солідній пухлині відсутня експресія CD38, яку можна виявити.
- 40 У солідної пухлини не виявляється експресія CD38, в разі, коли експресія CD38 в тканині солідної пухлини або в клітинах, виділених з солідною пухлини, є статистично незначною у порівнянні з контролем, наприклад, експресія, що виявляється при використанні антитіла до CD38, в порівнянні з експресією, яка виявляється при використанні ізотипічного контрольного антитіла з застосуванням добре відомих способів.
- 45 Антитіла до CD38, які використовують у способах винаходу, також можуть бути вибрані de novo, наприклад, із бібліотеки фагового дисплея, де фаги сконструйовані для експресії людських імуноглобулінів або їх частин, таких як Fab, одноланцюгові антитіла (scFv), непарні або парні варіабельні області антитіла (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-зв'язуючі варіабельні домени можна виділити, наприклад, з бібліотек фагового дисплея, що експресують варіабельні області важкого і легкого ланцюгів антитіла як гібридні білки з білком оболонки рІХ бактеріофага, як описано в публікації Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 і міжнародній патентній публікації № WO 09/085462. Бібліотеки антитіл можна піддавати скринінгу на зв'язування з позаклітинним доменом людського CD38, отримані позитивні клони можна додатково характеризувати, виділяти з лізатів клонів Fab, а потім клонувати як повнорозмірні антитіла. Такі способи з використанням способів фагового дисплея для виділення людських антитіл визнані в цій галузі. Див., наприклад: Патент США № 5,223,409, патент США № 5,403,484, патент США № 5,571,698, патент США № 5,427,908, патент США № 5,580,717, патент США № 5,969,108, патент США № 6,172,197, патент США №
- 60

5,885,793, патент США № 6,521,404, патент США № 6,544,731, патент США № 6,555,313, патент США № 6,582,915 та патент США № 6,593,081.

У деяких варіантах втілення антитіло до CD38 має ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

5 Fc-фрагмент антитіла може опосередковувати ефекторні функції антитіла, такі як антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (АЗКЦ), антитілозалежний клітинний фагоцитоз (АЗКФ) або комплементзалежна цитотоксичність (КЗЦ). Така функція може бути опосередкована зв'язуванням ефекторного (-их) домену (-ів) Fc із Fc-рецептором на імунній клітині з фагоцитарною або літичною активністю або зв'язуванням ефекторного (-их) домену (-ів) Fc з компонентами системи комплементу. Зазвичай ефект (-и), опосередкований (-и) Fc-зв'язувальними клітинами або компонентами комплементу, призводить (-ять) до інгібування й/або виснаження клітин-мішеней, наприклад клітин, що експресують CD38. Ізотипи IgG людини IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 проявляють різну здатність до здійснення ефекторних функцій. АЗКЦ може бути опосередкована IgG1 і IgG3, АЗКФ може бути опосередкований IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, а КЗЦ може бути опосередкована IgG1 і IgG3.

15 Антитіла, які по суті є ідентичними антитілу, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу. У контексті цього документа термін "по суті ідентичні" означає, що дві амінокислотні послідовності VH або VL антитіла, які порівнюють, є однаковими або мають "несуттєві відмінності". Несуттєві відмінності - це заміщення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот у послідовності важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла, які не мають негативного впливу на властивості антитіла. Відсоток ідентичності можна визначити, наприклад, шляхом попарного вирівнювання з використанням налаштувань за замовчуванням модуля AlignX Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, м. Карлсбад, штат Каліфорнія, США). Послідовності білка згідно з цим винаходом можна використати як послідовність запиту для здійснення пошуку в публічно доступних або патентних базах даних, наприклад, для визначення споріднених послідовностей. Типовими програмами, які використовують для здійснення таких пошуків, є програми XBLAST або BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) або комплект GenomeQuest™ (GenomeQuest, м. Уестборо, штат Массачусетс, США) з використанням налаштувань за замовчуванням. Приклади заміщень, які можуть бути виконані в антитілах, що специфічно зв'язуються з CD38, являють собою, наприклад, консервативні заміщення амінокислотою, яка має аналогічний заряд, гідрофобні або стереохімічні характеристики. Для покращення властивостей антитіл, наприклад стабільності або афінності, або для покращення ефекторних функцій антитіл можуть також бути виконані консервативні заміщення. Можуть бути виконані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислотних заміщень, наприклад, у важкому або легкому ланцюзі антитіла до CD38. Крім того, будь-який нативний залишок у VH або VL може бути також заміщений аланіном, як було описано раніше для аланінсканувального мутагенезу (MacLennan et al., Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, 1998; Sasaki et al., Adv Biophys 35:1-24, 1998). Фахівці в цій галузі можуть визначити бажані заміщення амінокислот на момент, коли такі заміщення є бажаними. Амінокислотні заміщення можна провести, наприклад, за допомогою ПЛР-мутагенезу (патент США № 4,683,195). Бібліотеки різновидів можна отримувати з використанням добре відомих способів, наприклад з використанням випадкових (NNK) або не випадкових кодонів, наприклад DVK-кодонів, які кодують 11 амінокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), і скринінгу бібліотек на різновиди з бажаними властивостями. Отримані різновиди можуть бути досліджені на їхнє зв'язування з CD38, їхню здатність індукувати АЗКЦ, АЗКФ або апоптоз або модулювати in vitro ферментативну активність CD38 з використанням способів, описаних у цьому документі.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, може зв'язуватись з людським CD38 в деякому діапазоні афінності (K_D). В одному варіанті втілення згідно з винаходом і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло, яке специфічно зв'язується з, CD38 зв'язується з CD38 із високою афінністю, наприклад із K_D , що дорівнює або є меншою ніж приблизно 10^{-7} М, наприклад, серед іншого, 1-9,9 (або будь-який діапазон або значення в цьому діапазоні, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9) $\times 10^{-8}$ М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М, 10^{-15} М, або будь-який діапазон або значення в цьому діапазоні, визначені за допомогою поверхневого плазмонного резонансу або способом Кіпеха, який використовують фахівці в цій галузі. Один приклад афінності дорівнює або є меншим ніж 1×10^{-8} М. Інший приклад афінності дорівнює або є меншим ніж 1×10^{-9} М.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, є біспецифічним антитілом. Області VL і/або VH існуючого антитіла до CD38 або області VL і VH, ідентифіковані de novo, як описано в цьому документі, можуть бути сконструйовані в біспецифічні

повнорозмірні антитіла. Такі біспецифічні антитіла можна створити шляхом модуляції взаємодій СНЗ між важкими ланцюгами моноспецифічних антитіл з отриманням біспецифічних антитіл з використанням методик, таких як ті, що описані в патенті США № 7,695,936; міжнародній патентній публікації № WO 04/111233; публікації патенту США № US 2010/0015133; публікації патенту США № US 2007/0287170; міжнародній патентній публікації № WO 2008/119353; публікації патенту США № US 2009/0182127; публікації патенту США № US 2010/0286374; публікації патенту США № US 2011/0123532; міжнародній патентній публікації № WO 2011/131746; міжнародній патентній публікації № WO 2011/143545 або публікації патенту США № US 2012/0149876. Додатковими біспецифічними структурами, у які можна вбудувати області VL і/або VH антитіл за цим винаходом, є, наприклад, імуноглобуліни з подвійним варіабельним доменом (міжнародна патентна публікація № WO 2009/134776) або структури, які включають різноманітні димеризаційні домени для поєднання двох плечей антитіла з відмінною специфічністю, такі як "лейцинова застібка" або колагенові димеризаційні домени (міжнародна патентна публікація № WO 2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441).

Наприклад, біспецифічні антитіла можна отримувати *in vitro* у безклітинному середовищі шляхом введення асиметричних мутацій у області СНЗ двох моноспецифічних гомодимерних антитіл і утворення біспецифічного гетеродимерного антитіла з двох батьківських моноспецифічних гомодимерних антитіл у відновних умовах, щоб забезпечити ізомеризацію дисульфідного зв'язку відповідно до способів, описаних у міжнародній патентній публікації № WO 2011/131746. У цих способах перше моноспецифічне двовалентне антитіло (наприклад, антитіло до CD38) і друге моноспецифічне двовалентне антитіло сконструйовані так, щоб мати певні заміщення в домені СНЗ, які сприяють стабільності гетеродимера; антитіла інкубують разом у відновних умовах, необхідних для забезпечення ізомеризації дисульфідного зв'язку в залишках цистеїну в шарнірній ділянці; таким чином створюють біспецифічне антитіло шляхом обміну Fab-плечей. Умови інкубації оптимально можуть бути відновлені до невідновних. Прикладами відновлювальних агентів, що можуть використовуватися, є 2-меркаптоетиламін (2-MEA), дитіотреїтол (DTT), дитіоеритритол (DTE), глутатіон, трис(2-карбоксіетил)фосфін (TCPEP), L-цистеїн і бета-меркаптоетанол, переважно відновлювальний агент вибирають із групи, що складається з: 2-меркаптоетиламіну, дитіотреїтолу й трис(2-карбоксіетил)фосфіну. Наприклад, можна використовувати інкубування протягом принаймні 90 хв. за температури принаймні 20 °C за присутності принаймні 25 mM 2-MEA або за присутності принаймні 0,5 mM дитіотреїтолу за pH у діапазоні 5-8, наприклад за pH 7,0 або за pH 7,4.

Прикладами мутацій в області СНЗ, які можна використовувати в першому важкому ланцюзі й у другому важкому ланцюзі біспецифічного антитіла, є K409R і/або F405L.

Способи цього винаходу можна використовувати для лікування хворих тварин, які належать до будь-якої класифікації. Приклади таких тварин включають ссавців, таких як люди, гризуни, собаки, кішки й свійські тварини.

Введення/фармацевтичні композиції

Антитіла, які специфічно зв'язані з CD38, можуть бути надані в способах відповідно до винаходу у відповідних фармацевтичних композиціях, що містять антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і фармацевтично прийнятний носій. Носій може являти собою розріджувач, ад'ювант, допоміжну речовину або носій, з яким вводять антитіло, яке специфічно зв'язує CD38. Такі носії можуть бути рідинами, такими як вода й олії, у тому числі олії з нафти, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія тощо. Наприклад, можна використовувати 0,4 % фізіологічний розчин і 0,3 % гліцин. Ці розчини повинні бути стерильними й не містити жодних твердих частинок. Їх можна стерилізувати за допомогою загальноприйнятих, добре відомих способів стерилізації (наприклад, шляхом фільтрації). Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як агенти, що коригують pH, та буферні агенти, стабілізуючі агенти, загущувачі, ковзні агенти й барвники тощо. Концентрація антитіл, які специфічно зв'язують CD38, у такій фармацевтичній композиції може змінюватися в широких межах, наприклад, від менш ніж приблизно 0,5 %, звичайно до принаймні приблизно 1 %, навіть до 15 або 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 % за масою, і буде вибрана в першу чергу виходячи з необхідної дози, об'ємів рідини, в'язкості тощо залежно від вибраного конкретного способу введення. Відповідні носії й композиції включно з іншими білками людини, наприклад сироватковим альбуміном людини, описані, наприклад, у публікації Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp. 691-1092, див. особливо pp. 958-989.

Спосіб введення антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, у способах винаходу може бути будь-яким відповідним способом, таким як парентеральне введення, наприклад, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне або підшкірне, легеневе, через слизові оболонки (пероральне, інтраназальне, інтравагінальне, ректальне), або іншими засобами, визнаними фахівцями й добре відомими в цій галузі. Антитіла, які специфічно зв'язують CD38, можна вводити внутрішньопухлинно шляхом, в дренажувачу ділянку лімфатичного вузла для місцевої доставки в пухлину із застосуванням відомих способів.

Антитіла, які специфічно зв'язують CD38, можна вводити пацієнту будь-яким прийнятним способом, наприклад, парентерально шляхом внутрішньовенної (в/в) інфузії або болюсної ін'єкції, внутрішньом'язово, підшкірно або внутрішньоочеревинним шляхом. Внутрішньовенну (в/в) інфузію можна, наприклад, вводити протягом 15, 30, 60, 90, 120, 180 або 240 хвилин або впродовж 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 годин.

Доза, яку вводять пацієнтові, є достатньою для полегшення або принаймні часткового призупинення захворювання, що підлягає лікуванню ("терапевтично ефективна кількість"), і може іноді становити від 0,005 мг до приблизно 100 мг/кг, наприклад від приблизно 0,05 мг до приблизно 30 мг/кг або від приблизно 5 мг до приблизно 25 мг/кг, або приблизно 4 мг/кг, приблизно 8 мг/кг, приблизно 16 мг/кг або приблизно 24 мг/кг, або, наприклад, приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мг/кг, але може бути навіть вищою, наприклад становити приблизно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мг/кг.

Можна також вводити фіксовану одиничну дозу, наприклад 50, 100, 200, 500 або 1000 мг, або доза може ґрунтуватися на площі поверхні тіла пацієнта, наприклад становити 500, 400, 300, 250, 200 або 100 мг/м². Зазвичай можна вводити від 1 до 8 доз (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8), але можна вводити 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше доз.

Введення антитіл, які специфічно зв'язують CD38, у способах згідно з цим винаходом можна повторювати через один день, два дні, три дні, чотири дні, п'ять днів, шість днів, один тиждень, два тижні, три тижні, один місяць, п'ять тижнів, шість тижнів, сім тижнів, два місяці, три місяці, чотири місяці, п'ять місяців, шість місяців або довше. Повторні курси лікування також можливі як довготривале введення. Повторне введення може бути в тій самій дозі або в іншій дозі. Наприклад, антитіла, які специфічно зв'язують CD38, у способах винаходу можна вводити в дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг з інтервалом один тиждень протягом 8 тижнів з наступним уведенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні два тижні протягом додаткових 16 тижнів з наступним уведенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні чотири тижні шляхом внутрішньовенної інфузії.

Антитіла, які специфічно зв'язують CD38, можна вводити відповідно до способів втілення цього винаходу у вигляді підтримуючої терапії, наприклад, один раз на тиждень протягом періоду 6 місяців або більше.

Наприклад, антитіла, які специфічно зв'язують CD38 відповідно до способів втілення цього винаходу, можуть бути забезпечені у вигляді добової дози в кількості приблизно 0,1-100 мг/кг, наприклад 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 або 100 мг/кг на добу принаймні в один із днів 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 або 40 або, альтернативно, принаймні в один із тижнів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 після початку лікування (або в будь-якій комбінації перерахованого) із використанням одноразових або розділених доз кожні 24, 12, 8, 6, 4 або 2 години (або будь-якої комбінації перерахованого).

Антитіла, які специфічно зв'язують CD38 відповідно до способів втілення цього винаходу, можна також вводити профілактично, щоб знизити ризик розвитку раку, уповільнити початок розвитку подій при прогресуванні раку та/або знизити ризик рецидиву в разі ремісії раку. Це може бути особливо корисним у пацієнтів, у яких важко визначити місце знаходження пухлини, присутність якої відома відповідно до інших біологічних факторів.

Антитіла, які специфічно зв'язують CD38, відповідно до способів втілення цього винаходу, можуть бути ліофілізовані для зберігання і відновлені в потрібному носії перед застосуванням. Доведено, що ця методика є ефективною під час використання звичайних білкових препаратів, і можна використовувати добре відомі методики ліофілізації й відновлення.

Антитіла, які специфічно зв'язують CD38, відповідно до способів втілення цього винаходу можна вводити в комбінації з другим терапевтичним агентом.

У способах втілення цього винаходу антитіла, які специфічно зв'язують CD38, можна вводити разом з будь-яким одним або більше з хіміотерапевтичних лікарських засобів або іншими протираковими терапевтичними засобами, відомими в цій галузі. Хіміотерапевтичні агенти являють собою хімічні сполуки, які застосовуються для лікування раку й включають агенти, що інгібують ріст, або інші цитотоксичні агенти, і включають алкілюючі агенти,

антиметаболіти, інгібітори проти мікротрубочок, інгібітори топоізомерази, інгібітори рецепторної тирозинкінази, інгібітори ангіогенезу тощо. Приклади хіміотерапевтичних засобів включають наступні засоби: алкілюючі агенти, наприклад, тіотепа і циклофосфамід (ЦИТОКСАН®); алкілсульфонати, наприклад, бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридины, наприклад, бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленіміни й метіламеламіни, включаючи альтретамін, тріетиленмеламін, тріетилентіофосфорамід, тріетилентіофосфорамід і триметилполмеламін; азотисті іприти, наприклад, хлорамбуцил, хлорнафазін, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретаміна оксиду гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, феностерид, преднімустин, трофосфамід, урацила іприт; нітрозосечовини, наприклад, кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустин; антибіотики, наприклад, аклациноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерін, блеоміцин, кактиноміцин, каліхеаміцин карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин, епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, мітоміцин, мікофенолова кислота, ногаламіцин, олівоміцин, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, хеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, наприклад, метотрексат і 5-FU; аналоги фолієвої кислоти, наприклад, деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, наприклад, флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, наприклад, анцитабін, азацитидин, 6-азаурідин, кармофур, цитарабін, дидезоксиурідин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; антиандрогени, наприклад, калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; засоби, що пригнічують функції надниркових залоз, наприклад, аміноглутетимід, мітотан, трилостан; поповнювач фолієвої кислоти, наприклад, фролінова кислота; ацеглатон; алдофосфаміду глікозид; амінолевулінова кислота; амсакрин; бестрабуцил; бізантрен; едотраксат; дефофамін; демекольцин; діазиквон; елфорнітин; ацетат еліптинію; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідамін; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; феномет; пірарубіцин; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофіран; спірогерманій; теноузонова кислота; тріазиквон; 2,2',2"-трихлортріетиламін; уретан; віндезин; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепу; представників сімейства таксоїдов або таксанов, наприклад, паклітаксел (ТАКСОЛ®) доцетаксел (ТАКСОТЕР®) та їхні аналоги; хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин С; мітоксантрон; вінкрестин; винорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (ДФМО); ретиноева кислота; еспераміцини; капецитабін; інгібітори рецепторів тирозинкінази та/або ангіогенезу, включаючи НЕКСАВАР® (сорafenіб), СУТЕНТ® (сунітиніб), ВОТРИЕНТ™ (пазопаніб), паладій™ (тоцераніб), ЗАКТИМА™ (вандетаніб), РЕЦЕНТИН® (цедираніб), регорафеніб (BAY 73- 4506), акситиніб (AG013736), лестауртиніб (CEP-701), ТАРЦЕВА® (ерлотиніб), ІРЕССА™ (гефітиніб), Гілотріф® (афатиніб), ТАЙКЕРБ® (лапатиніб), нератиніб тощо, а також фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої зі сполук, перерахованих вище Також у це визначення включені протигормональні агенти, дія яких регулює або інгібує вплив гормонів на пухлини, такі як антиестрогени, включаючи, наприклад, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-імідазоли, що інгібують ароматазу, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон і FARESTON® (тореміфен); і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гозерелін; а також фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої зі сполук, перерахованих вище. Інші звичайні цитотоксичні хімічні сполуки, які описані в Wiemann et al., 1985, у Medical Oncology (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, також можна застосовувати в способах цього винаходу.

Приклади агентів, які можуть бути використані в комбінації з антитілом, що специфічно зв'язує CD38, відповідно до способів втілення цього винаходу, включають інгібітори тирозинкінази і націлені протиракові препарати, наприклад, ІРЕССА™ (гефітиніб) і Тарцева® (ерлотиніб), а також інші антагоністи HER2, HER3, HER4 або VEGF. Приклади антагоністів HER2 включають CP-724-714, HERCEPTIN™ (трастузумаб), OMNITARG™ (пертузумаб), TAK-165, ТАЙКЕРБ® (лапатиніб) (інгібітор EGFR і HER2) і GW-282974. Приклади антагоністів HER3 включають антитіла до Her3 (див., наприклад, патентну публікацію № 2004/0197332). Приклади антагоністів HER4 включають мiPHK проти HER4 (див., наприклад, Maatta et al., Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006). Прикладом антагоніста VEGF є Авастин™ (бевацизумаб).

Приклади агентів, які можуть бути використані в комбінації з антитілом, що специфічно зв'язує CD38, відповідно до способів втілення цього винаходу, включають стандартні лікарські препарати для лікування солідних пухлин або інгібітори контрольних точок імунної відповіді.

Другий терапевтичний агент відповідно до способів втілення цього винаходу може являти собою інгібітор контрольних точок імунної відповіді.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-1, антитіло до PD-L1, антитіло до PD-L2, антитіло до LAG3, антитіло до TIM3 або антитіло до CTLA-4.

У деяких варіантах здійснення інгібітор контрольних точок імунної відповіді є антагоністичне антитіло до PD-1, антагоністичне антитіло до PD-L1, антагоністичне антитіло до PD-L2, антагоністичне антитіло до LAG3 або антагоністичне антитіло до TIM3.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-1.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-L1.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-L2.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до LAG3.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до TIM3.

У деяких варіантах здійснення інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до CTLA-4.

Будь-які антагоністичні антитіла до PD-1 можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу. Типовими антитілами до PD-1, які можна використовувати, є ОПДИВО® (ніволумаб) і КЕЙТРУДА® (пембролізумаб). Препарат ОПДИВО® (ніволумаб) описаний, наприклад, в патенті США № 8,008,449 (антитіло 5C4) і містить VH із SEQ ID NO: 24 та VL із SEQ ID NO: 25. Препарат КЕЙТРУДА® (пембролізумаб) описаний, наприклад, в патенті США № 8,354,509 і містить VH із SEQ ID NO: 22 та VL із SEQ ID NO: 23. Амінокислотні послідовності ніволумаба та пембролізумаба також доступні в реєстрі CAS. Додаткові придатні до використання антитіла до PD-1 описані в патенті США № 7,332,582, патентній публікації США № 2014/0044738, міжнародній патентній публікації № WO 2014/17966 і патентній публікації США № 2014/0356363.

Термін "антагоніст" стосується молекули, яка при зв'язуванні з клітинним білком пригнічує щонайменше один тип реакції або активності, індукованої лігандом білка. Молекула є антагоністом, якщо відбувається пригнічення щонайменше одного типу реакції або активності щонайменше на приблизно 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 100 % в порівнянні з пригніченням щонайменше одного типу реакції або активності за відсутності антагоніста (наприклад, в негативному контролі), або в разі, коли пригнічення є статистично значущим в порівнянні з пригніченням за відсутності антагоніста. Антагоністом може бути антитіло, розчинний ліганд, мала молекула, ДНК або РНК, наприклад, міРНК. Типова реакція або активність, що активується, наприклад, зв'язуванням PD-1 з відповідним рецептором PD-L1 або PD-L2, може являти собою зниження проліферації антигенспецифічних клітин CD4⁺ або CD8⁺ або зниження вироблення інтерферону (IFN-γ) Т-клітинами, що призводить до пригнічення імунних відповідей на, наприклад, пухлину. Типова реакція або активність, що активується зв'язуванням TIM-3 зі своїм рецептором, таким як галектін-9, може являти собою зниження проліферації антигенспецифічних клітин CD4⁺ або CD8⁺, зниження вироблення IFN-γ Т-клітинами або зниження поверхневої експресії CD137 на клітинах CD4⁺ або CD8⁺, що призводить до пригнічення імунних відповідей на, наприклад, пухлину. Отже, антагоністичне антитіло до PD-1, що специфічно зв'язує PD-1, антагоністичне антитіло до PD-L2 та антагоністичне антитіло, що специфічно зв'язує TIM-3, індукують імунні відповіді шляхом інгібування інгібіторних шляхів.

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNE
KFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTTVTVSS

SEQ ID NO: 23

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVGPARG
FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 24

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKRYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 25

5 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGT KVEIK

Посилючі імунну відповідь антитіла до PD-L1 можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу (наприклад, антагоністичні антитіла до PD-L1). Типовими придатними для використання антитілами до PD-L1 є дурвалумаб, атезолізумаб і авелумаб, а також антитіла, описані, наприклад, в патентній публікації США № 2009/0055944, патенті США № 8,552,154, патенті США № 8,217,149 та патенті США № 8,779,108.

Дурвалумаб містить VH із SEQ ID NO: 26 та VL із SEQ ID NO: 27.

Атезолізумаб містить VH із SEQ ID NO: 28 та VL із SEQ ID NO: 29.

Авелумаб містить VH із SEQ ID NO: 30 та VL із SEQ ID NO: 31.

SEQ ID NO: 26

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD
SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGELAFDYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 27

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK

PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LPTWTFGQGT KVEIK

20 SEQ ID NO: 28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 29

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS

25 GSGTDFLTISSELPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT KVEIK

SEQ ID NO: 30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 31

30 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGT KVTVL

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 24 та VL із SEQ ID NO: 25, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 22 та VL із SEQ ID NO: 23, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 26 та VL із SEQ ID NO: 27, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 28 та VL із SEQ ID NO: 29, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 30 та VL із SEQ ID NO: 31, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб підвищення імунної відповіді у пацієнта, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з

Посилючі імунну відповідь антитіла до LAG-3 можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу. Прикладами антитіл до LAG-3, які можна використовувати, є, наприклад, антитіла, описані в міжнародній патентній публікації № WO 2010/019570.

5 Посилючі імунну відповідь антитіла до CTLA-4 можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу. Прикладом антитіла до CTLA-4, яке можна використовувати, є інілімумаб.

Антитіла до PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM3 та CTLA-4, які можна використовувати відповідно до способів втілення цього винаходу, також можна створювати de novo з застосуванням способів, описаних в цьому документі.

10 У деяких варіантах здійснення можуть бути використані антитіла до PD-1, що містять VH з SEQ ID NO: 32 та VL із SEQ ID NO: 33.

У деяких варіантах здійснення можуть бути використані антитіла до PD-1, що містять VH з SEQ ID NO: 34 та VL із SEQ ID NO: 35.

15 У деяких варіантах здійснення можуть бути використані антитіла до TIM-3, що містять VH з SEQ ID NO: 36 та VL із SEQ ID NO: 37.

У деяких варіантах здійснення можуть бути використані антитіла до TIM-3, що містять VH з SEQ ID NO: 38 та VL із SEQ ID NO: 39.

SEQ ID NO: 32

20 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFDITANYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 34

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLSVAYISGGGANTYYLDN
VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 35

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKSASQSISGIPARFSGS
GSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGGTKLEIK

30 SEQ ID NO: 36

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 37

35 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQGGHAPITFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 38

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYPGDGDIRYTO
NFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQRNYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 39

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGQSYSTPFGQGGTKLEIK

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 32 та VL із SEQ ID NO: 33, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

45 Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 34 та VL із SEQ ID NO: 35, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

50 Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в комбінації з антитілом до TIM-3, що містить VH із SEQ ID NO: 36 та VL із SEQ ID NO: 37, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що має солідну пухлину, який включає введення пацієнту, що потребує лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5 в

комбінації з антитілом до TIM-3, що містить VH із SEQ ID NO: 38 та VL із SEQ ID NO: 39, протягом часу, достатнього для лікування солідної пухлини.

У способах відповідно до винаходу комбінацію антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і другого терапевтичного агента можна вводити в будь-яких відповідних тимчасових рамках. Наприклад, антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і другий терапевтичний агент можна вводити пацієнту в той самий день і навіть в складі однієї внутрішньовенної інфузії. Однак антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і другий терапевтичний агент також можна вводити поперемінно в різні дні або поперемінно в різні тижні або місяці тощо. У способах антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і другий терапевтичний агент можна вводити з достатньою близькістю за часом так, щоб вони були одночасно присутні (наприклад, у сироватці) на виявлюваних рівнях у пацієнта, якого лікують. У деяких варіантах втілення весь курс лікування антитілом, яке специфічно зв'язує CD38, складається з кількості доз, які вводять протягом певного періоду часу після або перед курсом лікування другим терапевтичним агентом, який також складається з деякої кількості доз. Відновлювальний період із 1, 2 або декількох днів або тижнів може бути використаний між введенням між введенням антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і другого терапевтичного агента.

Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, або комбінацію антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і другого терапевтичного агента можна вводити разом з будь-якою формою променевої терапії, включаючи зовнішню дистанційну променеву терапію, променеву терапію з модульованою інтенсивністю (IMRT), фокусоване опромінення і будь-яку форму радіохірургії, включаючи гамма-ніж, кібер-ніж, лінійний прискорювач і інтерстиціальне випромінювання (наприклад, імплантоване радіоактивне "насіння", балонну систему GliaSite), та/або хірургії.

Орієнтовані методи випромінювання, які можуть бути використані, включають стереотаксичну радіохірургію, фракційну стереотаксичну радіохірургію та променеву терапію модульованої інтенсивності (IMRT). Цілком очевидно, що стереотаксична радіохірургія включає точну доставку випромінювання до пухлинної тканини, наприклад, пухлину головного мозку, уникаючи при цьому навколишньої непухлинної нормальної тканини. Доза радіації, що застосовується при використанні стереотаксичної радіохірургії, може коливатись в межах, як правило, від 1 Гр до приблизно 30 Гр, і може включати в себе проміжні діапазони, в тому числі, наприклад, дози від 1 до 5, 10, 15, 20, 25 та до 30 Гр. Через неінвазивні пристрої фіксації, стереотаксичне випромінювання не має обов'язково бути доставлене за один сеанс лікування. План лікування може бути надійно дубльований протягом декількох днів, таким чином, дозволяючи доставити численні фракційні дози радіації. При використанні для лікування пухлини з плином часу, метод радіохірургії називається "фракційна стереотаксична радіохірургія" або FSR. На противагу цьому радіохірургія відноситься до лікування за один сеанс. Фракційна стереотаксична радіохірургія може привести до високого терапевтичного співвідношення, тобто, високої швидкості загибелі пухлинних клітин при низькому впливі на нормальні тканини. Пухлини і нормальна тканина по-різному реагують на високі разові дози радіації в порівнянні з впливом кількох менших доз радіації. Поодинокі великі дози радіації можуть вбити більше нормальної тканини, ніж кілька менших доз випромінювання. Відповідно, дещо менші дози радіації можуть вбити більше пухлинних клітин, менше зачіпаючи нормальну тканину. Доза радіації, що застосовується при використанні фракційного стереотаксичного випромінювання, може коливатись в межах, як правило, від 1 Гр до приблизно 50 Гр, і може включати в себе проміжні діапазони, в тому числі, наприклад, дози від 1 до 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 та до 50 Гр в гіпофракційних дозах. Також можуть бути використана променева терапія з модульованою інтенсивністю (IMRT). IMRT є розширеним режимом високоточної тривимірної конформної променевої терапії (3DCRT), який використовує керовані комп'ютером лінійні прискорювачі для постачання точних доз радіації до злоякісної пухлини або конкретних областей всередині пухлини. У 3DCRT профіль кожного пучка випромінювання має форму, що відповідає профілю мішені з боку випромінювання променя (BEV), з використанням багатопелюсткового коліматора (MLC), в результаті чого отримується декілька променів. IMRT дозволяє створити дозу радіації, що більш точно відповідає тривимірній (3-D) формі пухлини, шляхом модуляції інтенсивності пучка випромінювання в декількох невеликих об'ємах. Відповідно, IMRT дозволяє спрямувати більш високі дози радіації в області пухлини при мінімізації дози, направленої до оточуючих нормальних критичних структур. IMRT покращує здатність більш точно спрямувати лікувальний обсяг до пухлини увігнутої форми, наприклад, коли пухлина обгорнута навколо вразливою структури, такої як спинний мозок, великий орган або кровоносна судина.

Підшкірне введення фармацевтичних композицій, що містять антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу

Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, можна вводити підшкірно у вигляді фармацевтичної композиції, що містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу.

Концентрація антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, у фармацевтичній композиції для підшкірного введення може становити приблизно 20 мг/мл.

5 Фармацевтична композиція, яку вводять підшкірно, може містити від приблизно 1200 мг до 1800 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1200 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

10 Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1600 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1800 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

Фармацевтична композиція, яку вводять підшкірно, може містити від приблизно 30 000 Од до 45 000 Од гіалуронідази.

15 Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1200 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 30 000 од. гіалуронідази.

Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1800 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 45 000 од. гіалуронідази.

20 Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1600 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 30 000 од. гіалуронідази.

Фармацевтична композиція для підшкірного введення може містити приблизно 1600 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 45 000 од. гіалуронідази.

Фармацевтична композиція, яку вводять підшкірно, може містити гіалуронідазу rHuPH20, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40.

25 rHuPH20 являє собою рекомбінантну гіалуронідазу (рекомбінантний HYLENEX®) і описана в міжнародній патентній публікації № WO 2004/078140.

Гіалуронідаза є ферментом, який розкладає гіалуронову кислоту (ЕС 3.2.1.35) і знижує в'язкість гіалуронану в позаклітинному матриксі, тим самим збільшуючи проникність тканин.

SEQ ID NO: 40

30 MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP
LDMSLFSFIGSPRINATGQGVITIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPV
DNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEEKAGKDFLVET
IKLGKLLRPNNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNASTALYPSIYLNTQQS
PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWG
35 TLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQL
EKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSQSTLSCKEKADVKDTPDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEE
PQIFYNASTPSTLSATMFIVSILFLISSVASL

Введення фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу можна ввести повторно через один день, два дні, три дні, чотири дні, п'ять днів, шість днів, один тиждень, два тижні, три тижні, чотири тижні, п'ять тижнів, шість тижнів, сім тижнів, два місяці, три місяці, чотири місяці, п'ять місяців, шість місяців або довше. Повторні курси лікування також можливі як довготривале введення. Повторне введення може бути в тій самій дозі або в іншій дозі. Наприклад, фармацевтичну композицію, яка містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу, можна вводити один раз на тиждень впродовж восьми тижнів, із наступним введенням один раз на два тижні впродовж 16 тижнів, із наступним введенням один раз на чотири тижні. Фармацевтичні композиції, призначені для введення, можуть містити приблизно 1200 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 30 000 од. гіалуронідази, причому концентрація антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, у фармацевтичній композиції становить приблизно 20 мг/мл. Фармацевтичні композиції, призначені для введення, можуть містити приблизно 1800 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 45 000 од. гіалуронідази. Фармацевтичні композиції, призначені для введення, можуть містити приблизно 1600 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 30 000 од. гіалуронідази. Фармацевтичні композиції, призначені для введення, можуть містити приблизно 1600 мг антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, і приблизно 45 000 од. гіалуронідази.

55 Фармацевтичну композицію, що містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу, можна вводити підшкірно в черевну область.

60 Фармацевтичну композицію, що містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу, можна вводити в загальному об'ємі приблизно 80 мл, 90 мл, 100 мл, 110 мл або 120 мл.

Для введення можна змішати 20 мг/мл антитіла, яке специфічно зв'язує CD38, у 25 мМ ацетату натрію, 60 мМ хлориду натрію, 140 мМ D-маніту, 0,04 % полісорбату-20 за рН 5,5 із rHuPH20, 1,0 мг/мл (75-150 кОд/мл) у 10 мМ L-гістидину, 130 мМ NaCl, 10 мМ L-метіоніну, 0,02 % полісорбату-80 за рН 6,5 перед введенням суміші суб'єктові.

Хоча винахід описано в загальних рисах, варіанти втілення винаходу будуть додатково описані в наведених нижче прикладах, які не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг формули винаходу.

Додаткові варіанти втілення винаходу

Нижче наведені деякі додаткові варіанти втілення винаходу відповідно до розкриття, наведеного в іншому місці цього опису. Наведені вище особливості варіантів втілення винаходу, які описані як такі, що відносяться до винаходу, розкритого в цьому документі, також відносяться до всіх без винятку цих додаткових пронумерованих варіантів втілення.

1. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування при лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину.

2. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування при лікуванні пацієнта, що страждає від захворювання, опосередкованого регуляторними Т-клітинами (Treg).

3. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування при лікуванні пацієнта, що страждає від захворювання, опосередкованого мієлоїдними супресорними клітинами (МСК), який включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з CD38.

4. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування для пригнічення активності регуляторних Т-клітин (Treg), що включає приведення регуляторних Т-клітин в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

5. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування для пригнічення активності мієлоїдних супресорних клітин (МСК), що включає приведення МСК в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38.

6. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування при лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, яке включає зниження числа регуляторних Т-клітин у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

7. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування при лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, яке включає зниження числа мієлоїдних супресорних клітин (МСК) у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіла, яке специфічно зв'язує CD38.

8. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-7, варіант відрізняється тим, що зазначене антитіло викликає імунну відповідь у пацієнта.

9. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-8, варіант відрізняється тим, що зазначена імунна відповідь є відповіддю ефекторних Т-клітин (Teff).

10. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-9, варіант відрізняється тим, що зазначена відповідь Teff опосередкована Т-клітинами CD4⁺ або Т-клітинами CD8⁺.

11. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіантів здійснення 9 або 10, варіант відрізняється тим, що зазначена відповідь Teff опосередкована Т-клітинами CD8⁺.

12. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-11, варіант відрізняється тим, що зазначена відповідь Teff полягає в підвищенні числа CD8⁺ Т-клітин, підвищенні проліферації CD8⁺ Т-клітин, підвищенні клонального розмноження Т-клітин, підвищення утворення клітин пам'яті CD8⁺, підвищенні антигензалежного вироблення антитіл або підвищенні вироблення цитокінів, хемокинів або інтерлейкінів.

13. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-13, вказане антитіло інгібує функцію імуносупресорних клітин.

14. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-14, варіант відрізняється тим, що зазначені імунні супресорні клітини є регуляторними Т-клітинами (Treg) або мієлоїдними супресорними клітинами (МСК).

15. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 15, варіант відрізняється тим, що зазначені клітини Treg є CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Т-клітинами.

16. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіантів здійснення 14 або 15, варіант відрізняється тим, що зазначені клітини Treg експресують CD38.

17. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 13-16, варіант відрізняється тим, що зазначена функція Treg знижується шляхом знищення клітин Treg.

18. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 17, варіант відрізняється тим, що зазначене знищення Treg опосередковано антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ), антитілозалежним клітинним фагоцитозом (АЗКФ), клітинзалежною цитотоксичністю (КЗЦ) або апоптозом, індукованим антитілом, яке специфічно зв'язує CD38.

19. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 17-18, варіант відрізняється тим, що зазначене знищення Treg опосередковано АЗКЦ.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 17-19, при якому відбувається знищення приблизно 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 % або 60 % клітин Treg.

21. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 14, варіант відрізняється тим, що зазначені клітини cMCK є клітинами CD11b⁺HLA-DR-CD14-CD33⁺CD15⁺.

22. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 21, варіант відрізняється тим, що зазначені клітини CD11b⁺HLA-DR-CD14-CD33⁺CD15⁺ експресують CD38.

23. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 21-22, варіант відрізняється тим, що зазначена функція MCK знижена шляхом знищення MCK.

24. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 23, варіант відрізняється тим, що зазначене знищення MCK опосередковано антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ), антитілозалежним клітинним фагоцитозом (АЗКФ), клітинзалежною цитотоксичністю (КЗЦ) або апоптозом, індукованим антитілом, яке специфічно зв'язує CD38.

25. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 23-24, варіант відрізняється тим, що зазначене знищення MCK опосередковано АЗКЦ.

26. Антитіло, що специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 23-25, варіант відрізняється тим, що відбувається знищення приблизно 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 % або 60 % клітин MCK.

27. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 14-26, варіант відрізняється тим, що зазначені клітини Teff або імунні супресорні клітини знаходяться в кістковому мозку або в периферичній крові.

28. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 14-27, варіант відрізняється тим, що солідна пухлина являє собою меланому, рак легень, плоскоклітинний недрібноклітинний рак легень (НДКРЛ), неплоскоклітинний НДКРЛ, колоректальний рак, рак простати, кастраційно-резистентний рак простати, рак шлунка, рак яєчника, рак ШКТ, рак печінки, рак підшлункової залози, рак щитовидної залози, плоскоклітинну карциному голови і шиї, карциному стравоходу й шлунково-кишкового тракту, рак молочної залози, рак фаллопіївх труб, рак головного мозку, рак уретри, урогенітальний рак, ендометріоз, рак шийки матки або метастатичні ураження при онкологічних захворюваннях.

29. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-28, варіант відрізняється тим, що в солідній пухлині відсутня експресія CD38.

30. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-29, варіант відрізняється тим, що антитіло конкурує за зв'язування CD38 з антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.

31. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-30, варіант відрізняється тим, що антитіло зв'язується щонайменше з

областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1).

32. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-31, варіант відрізняється тим, що антитіло містить послідовності областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно.

33. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-32, варіант відрізняється тим, що антитіло містить послідовності областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) та 3 (LCDR3) із SEQ ID NO: 9, 10 та 11 відповідно.

34. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-33, варіант відрізняється тим, що антитіло містить послідовності HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 і 11 відповідно.

35. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-34, варіант відрізняється тим, що антитіло містить VH, який на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичний SEQ ID NO: 4, та VL, яка на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 5.

36. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-31, варіант відрізняється тим, що антитіло містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5.

37. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-29, варіант відрізняється тим, що антитіло містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3:

- a. VH із SEQ ID NO: 14 та VL із SEQ ID NO: 15;
- b. VH із SEQ ID NO: 16 та VL із SEQ ID NO: 17;
- c. VH із SEQ ID NO: 18 та VL із SEQ ID NO: 19; або
- d. VH із SEQ ID NO: 20 та VL із SEQ ID NO: 21.

38. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 37, варіант відрізняється тим, що антитіло до CD38 містить:

- a. VH із SEQ ID NO: 14 та VL із SEQ ID NO: 15;
- b. VH із SEQ ID NO: 16 та VL із SEQ ID NO: 17;
- c. VH із SEQ ID NO: 18 та VL із SEQ ID NO: 19; або
- d. VH із SEQ ID NO: 20 та VL із SEQ ID NO: 21.

39. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-38, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з другим терапевтичним агентом.

40. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 39, варіант відрізняється тим, що другий терапевтичний агент являє собою хіміотерапевтичний агент, націлену протиракову терапію, стандартний лікарський препарат для лікування солідних пухлин або інгібітор контрольних точок імунної відповіді.

41. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 40, варіант відрізняється тим, що інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-1, антитіло до PD-L1, антитіло до PD-L2, антитіло до LAG3, антитіло до TIM3 або антитіло до CTLA-4.

42. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до варіанта здійснення 39, варіант відрізняється тим, що другий терапевтичний агент вводять одночасно, послідовно або окремо.

43. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, для застосування відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-42, варіант відрізняється тим, що пацієнта отримує лікування променевою терапією.

44. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину.

45. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 22 та VL із SEQ ID NO: 23.

46. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 24 та VL із SEQ ID NO: 25.

47. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта.

48. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 22 та VL із SEQ ID NO: 23.

49. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-1, що містить VH із SEQ ID NO: 24 та VL із SEQ ID NO: 25.

50. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 26 та VL із SEQ ID NO: 27.

51. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 28 та VL із SEQ ID NO: 29.

52. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування в лікуванні пацієнта, що має солідну пухлину, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 30 та VL із SEQ ID NO: 31.

53. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 26 та VL із SEQ ID NO: 27.

54. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 28 та VL із SEQ ID NO: 29.

55. Антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, що містить VH із SEQ ID NO: 4 та VL із SEQ ID NO: 5, для застосування для підвищення імунної відповіді у пацієнта, варіант відрізняється тим, що антитіло вводять в комбінації з антитілом до PD-L1, що містить VH із SEQ ID NO: 30 та VL із SEQ ID NO: 31.

Приклад 1. Загальні матеріали та способи

Збір та обробка зразків

Аспірати периферійної крові та кісткового мозку збирали в пробірки з гепарином на вихідному рівні безпосередньо перед першим введенням та в конкретні моменти часу під час лікування. Більшість зразків оцінювали з використанням проточної цитометрії в реальному часі одразу після їхньої доставки в центральну лабораторію протягом 24-48 годин після зібрання. З цільної крові шляхом центрифугування в градієнті щільності отримували моноклеарні клітини периферійної крові (МКПК), які зберігали замороженими до початку аналізу. Аналізи супресії CD38⁺ Treg, клональності та активації Т-клітин у зразках, взятих до та після лікувальних процедур виконувались одночасно з використанням заморожених зразків МКПК.

В міжнародній центральній лабораторії BARC була виконана способом проточної цитометрії оцінка експресії CD38 і клітин мієломи (CD138⁺), NK-клітин, Т-клітин та В-клітин з використанням попередньо валідованого імунофенотипового аналізу. Скорочено: зразки крові та кісткового мозку були забарвлені з використанням наступних мультифлуорохромних панелей антитіл: панель клітинної лінії: PerCPCy5.5α-CD19 (клон HIB19; компанія Becton Dickinson [BD]), APCα-CD24 (SN3; компанія eBioscience), PC7α-CD3 (UCHT-1; компанія Beckman Coulter), V500α-CD16 (3G8; BD) та PEα-CD56 (MY; BD); панель регуляторних Т-клітин (T_{reg}): APCα-CD25 (2A3; BD), PEα-CD127 (HIL-7R-M21; BD), APC-H7α-HLA-DR (G46-6; BD) та PerCPα-CD4 (L200; BD); панель наївних Т-клітин/Т-клітин пам'яті: APC-H7α-CD4 (RPA-T4; BD), PerCP-Cy5.5α-CD8 (RPA-T4 BD), PEα-CD62L (SK11; BD) та APCα-CD45RA (HI100; BD). експресію CD38 оцінювали з використанням міченого Alexa 647 антитіла mAb 003, описаного в патенті США № 7,829,693, яке містить послідовності VH та VL із SEQ ID NO: 14 та SEQ ID NO: 15. Зразки крові готували з використанням різних способів лізування та промивання. Зразки аспіратів кісткового мозку забарвлювали мембранно або внутрішньоклітинно з використанням різних антитіл. Для лізування червоних кров'яних тілець периферійної крові використовували розчин для лізування Becton Dickinson FACSLysing, а для внутрішньоклітинного забарвлення зразків аспірату

кісткового мозку використовували пермеабілізуючий реагент Fix and Perm від компанії Invitrogen. Оцінку забарвлених зразків проводили з використанням проточного цитометра FACS Canto II, а дані аналізували з використанням програмного забезпечення FACS Diva. Абсолютне число популяцій імунних клітин у зразках крові й відсоткове значення лімфоцитів в зразках кісткового мозку визначали на всіх досліджуваних моментах часу.

Секвенування рецепторів Т-клітин (РТК)

Різноманітність Т-клітин аналізували шляхом глибокого секвенування перебудов РТК для оцінки клональності CD8⁺ Т-клітин з використанням геномної ДНК зразків МКПК. Секвенування РТК проводили з використанням комерційного способу аналізу ImmunoSeq™ від компанії Adaptive Biotechnologies, а аналіз проводили з використання попередньо оціненого багатоканального аналізу із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (TR2015CRO-V-019), який включав застосування прямих і зворотних праймерів націлених безпосередньо на сімейство варіабельних (V) генів (прямі праймери) і сполучних (J) генів (зворотні праймери). Праймер для кожного з генів V та J ініціював первинний контакт пар для ампліфікації соматично рекомбінованих РТК та кожен праймер містив спеціальну універсальну послідовність ДНК. Після ПЛР-ампліфікації кожен амплікон ампліфікували вдруге із застосуванням прямих і зворотних праймерів, що містять універсальну послідовність та адапторну послідовність, необхідну для секвенування ДНК способом Illumina.

Т-клітинні відповіді на вірусні антигени та алоантигени

МКПК пацієнтів висівали в 96-ямкові планшети (2×10⁵ клітин/ямку) й стимулювали протягом 5 днів сумішшю з 23 вірусних пептидів людського цитомегаловірусу (ЦМВ), вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) і вірусу грипу, рестрикованих за головним комплексом гістосумісності (ГКГС) класу I (2 мкг/мл; пул пептиду CEF; PANATecs®) або еквівалентною кількістю алогенних МКПК здорових донорів, опромінених дозою в 25 Гр. Нестимульовані МКПК і стимульовані покритими анти-CD3/CD28 гранулами МКПК використовувались в якості негативного і позитивного контролів відповідно. На 5 день визначали кількість інтерферону-γ (IFN-γ) в безклітинному супернатанті з використанням "сандвіч"-способу твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА; людський гамма-інтерферон з набору для ІФА Ready-SET-Go; eBioscience), отримані дані були використані в якості сурогатного маркера активації Т-клітин.

Пригнічення регуляторними Т-клітинами (Трег) ефекторних клітинних функцій: аналіз розведення в сукцинімидиловому естері карбоксифлуоресцеїну (CFSE)

МКПК здорових донорів мітили PerCP-Cy5.5α-CD3 (SK7; BD), KOα-CD45, (J33; Beckman Coulter), V450α-CD4 (SK3; BD), PEα-CD25 (M-A251, BD), PE Cy7α-CD127 (HIL-7R-M21; BD) і APCα-CD38 (HB-7; BD) і сортували методом FACS Aria (BD). Відсортовані ефекторні клітини мітили сукцинімидиловим естером карбоксифлуоресцеїну (CFSE; eBioscience) і стимулювали покритими анти-CD3/CD28 гранулами в присутності або за відсутності клітин CD38⁺ Трег або клітин CD38⁻ Трег (співвідношення Трег:ефекторні клітини 1:1) в RPMI з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки. Через 72 години проводили аналіз способом проточної цитометрії, в якості сурогату проліферації Т-клітин використовували відсоткове розведення CFSE.

Фенотипування мієлоїдних супресорних клітин (МСК) та АЗКЦ, опосередкована препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб)

МКПК трьох нормальних здорових донорів культивували спільно з пухлинними клітинними лініями мієломи (RPMI8226, U266, H929) протягом шести днів та оцінювали півень вироблення гранулоцитарних МСК (Г-МСК) (CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁺CD15⁺CD33⁺), відповідно до способу, описаного в Gorgun et al., Blood 121: 2975-87, 2013. Г-МСК не були присутні в нормальних здорових МКПК, однак після спільного культивування з усіма трьома клітинними лініями мієломи, Г-МСК були присутні у відносній кількості 5-25 % від загальної популяції МКПК (дані не показані). Стратегія гейтування для оцінки способом проточної цитометрії Г-МСК включала CD11b⁺ в якості першого гейту з подальшим гейтуванням за CD14⁻ HLA-DR⁺ та наступним за CD15⁺ та CD33⁺. Клітини Г-МСК були відсортовані та були оцінені рівні експресії CD38 і чутливість до АЗКЦ, опосередкована препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Для оцінки впливу препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) на АЗКЦ/КЗЦ в клітинах МСК, при аналізі АЗКЦ додавали сироватку, що містила фермент або ізотипічний контроль.

Аналіз наївних Т-клітин і Т-клітин пам'яті

Перед кожною інфузією препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) у пацієнтів брали зразки периферичної крові, які стабілізували гепарином. Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) виділяли шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-гіпак і зберігали в кріоконсервуючому середовищі (RPMI з додаванням 10 % людської сироватки і 10 % диметилсульфоксиду) в рідкому азоті. Для аналізу FACS МКПК розморожували і

ресуспендували в кількості 2×10^6 клітин/панель в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) з 0,05 % азиду і 0,1 % HAS.

Аналіз даних

Аналіз усіх даних і побудова відповідних графіків проводили виключно за допомогою програмного забезпечення R (R: Мова і середовище для статистичних розрахунків, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org/>). В аналіз були включені дані всіх суб'єктів, що проходили лікування та показували відповідь, що піддавалась оцінці. Відповідно, в тексті цього документу пацієнти з відповіддю визначені як суб'єкти з найкращою відповіддю на лікування (на думку незалежного наглядового комітету) з досягненням сПР (строго повна ремісія), ДХЧР і ЧР, а пацієнти без відповіді визначені як суб'єкти з найкращою відповіддю на лікування (на думку ННК) з досягненням МВ, СЗ і ПЗ (прогресування захворювання).

Різні статистичні порівняння включали (i) вихідні рівні пацієнтів з відповіддю й без відповіді, (ii) порівняння вихідних рівнів і рівнів після лікування пацієнтів з відповіддю й без відповіді, (iii) відсоткова зміна у пацієнтів з відповіддю й без відповіді, (iv) зміни в співвідношенні між вихідними рівнями й рівнями після лікування. Кожне порівняння включало оцінку нормальності розподілу за критерієм Шаніро-Уілкі (Royston (1995) Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The W test for normality. Applied Statistics, 44, 547-551). Було виявлено переважна частина даних не має нормального розподілу. Диференціальний рівень дослідження включав застосування непараметричного рангового критерію Уїлкокса (Hollander and Wolfe (1973), Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. стор. 27–33 (одновибірковий), 68–75 (двовибірковий) і t-критерію з подальшим перетворенням Бокса-Кокса (Weisberg, S. (2014) Applied Linear Regression, Fourth Edition, Wiley Wiley, глава 7). У разі перетворення Бокса-Кокса до величин, що дорівнювали нулю, додавали мале число ($1e-07$). У всіх випадках результати обох тестів були узгодженими. Р-значення, отримані за ранговим критерієм Уїлкокса, наведені в таблицях в тексті цього документу, якщо не вказано інше. При проведенні дослідження відмінностей між вихідним рівнем та рівнем після лікування в пацієнтів з відповіддю й без відповіді застосовували двогруповий парний критерій, у всіх інших випадках застосовували двогруповий непарний критерій.

Оскільки зразки для аналізу різних популяцій лімфоцитів отримували в різні моменти часу для різних режимів дозування, було проведено моделювання популяцій. Підгонку моделі проводили за порядком візитів. Моделювання популяцій для загальної кількості NK-клітин та кількості активованих NK-клітин включало апроксимацію з використанням моделі «розламаного стрижня» (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.). Лінійні моделі зі змішаними ефектами з випадковою січною і нахилом були апроксимовані з використанням наступних даних пацієнтів: субпопуляції В-клітин, Т-клітин, популяції лейкоцитів, моноцитів, нейтрофілів і гранулоцитів (Bates et al., (2014). "lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4". ArXiv e-print; подана в Journal of Statistical Software, <http://arxiv.org/abs/1406.5823>). Таке лінійне моделювання зі змішаними ефектами проводили в відповідний день після початку лікування (ADY). Апроксимацію лінійної моделі зі змішаними ефектами проводили для логарифмічно перетворених змінних відповіді. У випадку, коли значення змінних відповіді дорівнювали нулю, до всіх значень змінних відповіді додавали 0,1, щоб зробити можливим моделювання за логарифмічною шкалою.

Приклад 2. Дизайн дослідження 54767414MMY2002 (SIRIUS)

Цільовою популяцією для дослідження 54767414MMY2002 (SIRIUS) були пацієнти з пізньою стадією множинної мієломи, які отримували щонайменше 3 попередні лінії терапії, включаючи терапію інгібітором протеасом (PI) і імуномодуючим лікарським препаратом (IMiD), або які не піддавались лікуванню препаратами PI і IMiD. Оцінки сприйнятливості для аналізу первинної кінцевої точки/кінцевого аналізу були засновані на оцінках незалежного наглядового комітету (ННК) і комп'ютеризованого алгоритму із застосуванням керівництва 2011 IMWG (Звіт з клінічного дослідження: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEXTM (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD (Відкрите багатоцентрове дослідження фази 2 ефективності та безпеки ДАРЗАЛЕКСу™ (даратумумабу) у суб'єктів з множинною мієломою, які отримували щонайменше 3 попередні лінії терапії (включаючи інгібітор протеасом і IMiD), або не піддавались лікуванню препаратами інгібітору протеасом і IMiD) (EDMS- ERI-92399922; de Weers et al., (2011) J Immunol 186 (3): 1840-1848).

Такі оцінки включали: загальний рівень відповіді (ЗРВ), тривалість відповіді, час до відповіді й найкраща відповідь, частоту клінічної ефективності, час до прогресування (ЧДП), виживаність без прогресування (ВБП) і загальну виживаність (ЗВ).

Загалом в цьому дослідженні препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) проходили лікування 124 суб'єкта (de Weers et al., (2011) J Immunol 186 (3): 1840-1848). 18 суб'єктів отримували препарат в дозах 8 мг/кг, а 106 суб'єктів отримували препарат в дозах 16 мг/кг. Режим дозування був наступним:

Група А. ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) 16 мг/кг Цикли 1 і 2: дні 1, 8, 15 і 22 (щотижня), цикли 3-6: дні 1 і 15 (раз в два тижні), цикл 7+: день 1 (кожні 4 тижні). Кожен цикл тривав 4 тижні.

Група В ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) 8 мг/кг Цикл 1+: день 1 (кожні 4 тижні).

Основною метою дослідження було визначення ефективності двох режимів лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) згідно з даними ЗРВ (ПР+ЧР) у суб'єктів з множинною мієломою, які отримували щонайменше 3 попередні лінії терапії, включаючи терапію PI і IMiD, або чие захворювання було подвійно рефрактерним до терапії PI і IMiD (Звіт з клінічного дослідження: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEXTM (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD (Відкрите багатоцентрове дослідження фази 2 ефективності та безпеки ДАРЗАЛЕКСу™ (даратумумабу) у суб'єктів з множинною мієломою, які отримували щонайменше 3 попередні лінії терапії (включаючи інгібітор протеасом і IMiD), або не піддавались лікуванню препаратами інгібітору протеасом і IMiD) EDMS-ERI-92399922).

Вторинні мети цього дослідження включали оцінку безпеки та переносимості препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), демонстрацію додаткових визначень ефективності (наприклад, частоти клінічної ефективності, ЧДП, ВБП і ЗВ), а також оцінку фармакокінетики, імуногенності, фармакодинаміки й дослідження біомаркерів, які дозволяють прогнозувати відповідь на ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Додаткова інформація щодо дослідження доступна з протоколу клінічного дослідження (Звіт з клінічного дослідження: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEXTM (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD (Відкрите багатоцентрове дослідження фази 2 ефективності та безпеки ДАРЗАЛЕКСу™ (даратумумабу) у суб'єктів з множинною мієломою, які отримували щонайменше 3 попередні лінії терапії (включаючи інгібітор протеасом і IMiD), або не піддавались лікуванню препаратами інгібітору протеасом і IMiD) EDMS-ERI-92399922).

На стадії 1 частини 1, 1 суб'єкт (6 %) продемонстрував відповідь в групі з дозою 8 мг/кг і 5 суб'єктів (31 %) продемонстрували відповідь в групі з дозою 16 мг/кг. Через це лише дослідження групи з дозою 16 мг/кг було продовжена до стадії 2 частини 1 і, надалі, до частини 2.

У групі з дозою 16 мг/кг 31 суб'єкт досягав відповіді ЧР або вище на підставі оцінки ННК; ЗРВ становив 29 % (95 % ДІ: 21 %, 39 %). Три суб'єкта (3 %) досягли сПР, а 13 суб'єктів (12 %) досягли ДХЧР або краще.

Приклад 3. Дія препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) на розмноження і активність Т-клітин у пацієнтів, включених у дослідження 54767414MMY2002 (SIRIUS)

CD38 експресується на багатьох імунних і гемопоетичних клітинах. Було проведено широке імунне профілювання способом проточної цитометрії для вивчення дії препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) на підгрупи імунних клітин, а також зв'язку вихідних рівнів цих клітин з клінічною відповіддю. Способом проточної цитометрії були оцінені різні популяції клітин, включаючи Т-клітини (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ і регуляторні Т-клітини (Treg)), В-клітини (CD19⁺), NK-клітини, моноцити (CD14⁺), лейкоцити і нейтрофіли, в периферичній крові й аспіратах кісткового мозку на вихідному рівні і після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), для відстеження змін в цих клітинних популяціях у пацієнтів з відповіддю й без відповіді.

Лімфоцити, лейкоцити, моноцити і нейтрофіли

Досліджували число лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів в периферичній крові у пацієнтів з відповіддю й без відповіді. Було виявлено, що загальна кількість лімфоцитів після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) була підвищена у пацієнтів з відповіддю при застосуванні обох доз - 8 мг/кг і 16 мг/кг (Фіг. 1). Лінійне моделювання зі змішаними ефектами виявило підвищення, що становить $0,8 \times 10^6$ клітин/мкл за log-шкалою за 100 днів (ДІ = 0,06, 0,11). Були виявлені незначні збільшення кількості моноцитів і лейкоцитів зі значним підвищенням, що становить $0,03 \times 10^6$ клітин/мкл (ДІ = 0,01, 0,04) і $0,03 \times 10^6$ клітин/мкл за log-шкалою (ДІ = 0,01, 0,05) за кожні 100 днів відповідно. Медіанне число нейтрофілів

узгоджувалося з вихідним рівнем і істотно не змінювалось, хоча в разі деяких пацієнтів спостерігалась нейтропенія.

- 5 Вихідні рівні цих клітинних популяцій порівнювали між групами з відповіддю. Після застосування знакового рангового критерію Уїлкоксона не було отримано жодних даних про різницю в вихідних рівнях будь-яких з цих типів клітин серед груп з відповіддю (Таблиця 1).

Таблиця 1

Число клітин периферичної крові у пацієнтів з відповіддю й без відповіді на вихідному рівні.					
	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	P-значення*
Лейкоцити В	33	4,3	4,32 (1,65)	1,6; 8,8	
Лейкоцити БВ	82	4,19	4,77 (2,26)	2,13; 13,8	0,60987
Лімфоцити В	33	0,9	1,09 (0,59)	0,27; 2,67	
Лімфоцити БВ	82	1	1,05 (0,55)	0,3; 2,8	0,85028
Моноцити В	33	0,43	0,5 (0,25)	0,2; 0,97	
Моноцити БВ	82	0,5	0,51 (0,25)	0,04; 1,3	0,72803
Нейтрофіли В	33	2,47	2,54 (1,23)	1,06; 5,94	
Нейтрофіли БВ	82	2,44	3,05 (2,08)	1; 11,7	0,40373
N: кількість зразків на групу					
В: пацієнт з відповіддю					
БВ: пацієнт без відповіді.					
* Пацієнт з відповіддю в порівнянні з пацієнтом без відповіді					
СВ: стандартне відхилення					

NK-клітини

- 10 Загальна кількість NK-клітин (CD16⁺CD56⁺) і активованих NK-клітин (CD16⁺CD56^{dim}) при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) зменшувалась з часом (дані не показані).

В-клітини

- 15 Під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) у пацієнтів з відповіддю й без відповіді протягом часу лікування вимірювали абсолютне число В-клітин (CD45⁺CD3⁺CD19⁺) в периферичній крові або аспіраті кісткового мозку. Число В-клітин трохи підвищилось в цільній крові й зберігалось на тому ж рівні в аспіратах кісткового мозку. Лінійне моделювання зі змішаними ефектами для В-клітин виявило мінімальне підвищення, що становить $0,1 \times 10^6$ клітин/мкл [D] = 0,04, 0,16] за 100 днів за лог-шкалою протягом курсу лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Під час лікування даратумумабом як у пацієнтів з відповіддю, так і без відповіді не спостерігалось змін відсоткового вмісту В-клітин (CD45⁺CD3⁺CD19⁺/лімфоцитів)
- 20 в аспіратах кісткового мозку (p = 0,1 і 0,4, відповідно). Крім того, не було отримано жодних свідомств того, що число В-клітин на вихідному рівні відрізнялося у пацієнтів з відповіддю й без відповіді (p = 0,5).

Т-клітини

- 25 Було відзначено, що при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) кількість лімфоцитів збільшилась (фіг. 1), незважаючи на те, що В-клітини демонстрували незначне підвищення кількості (див. вище). Для отримання додаткових даних досліджували різні популяції Т-клітин (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клітини, регуляторні Т-клітини) в периферичній крові та в кістковому мозку.

- 30 Число Т-клітин CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ в периферичній крові після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) було підвищеним (як абсолютне число/мкл, так і відсотковий вміст лімфоцитів). На фіг. 2 показана відсоткова зміна абсолютного числа CD3⁺ Т-клітин (CD45⁺CD3⁺) від вихідного рівня в периферичній крові протягом часу для кожного пацієнта. Чорною лінією на фігурі вказано медіанне абсолютне число $\times 10^6$ клітин/мкл для всіх пацієнтів. В дані, відображені на фігурі, були включені дані тільки для візитів з більш ніж 2 спостереженнями. На фіг. 3 показана відсоткова зміна абсолютного числа CD4⁺ Т-клітин (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) від вихідного рівня в периферичній крові протягом часу для кожного пацієнта. Чорною лінією на фігурі вказано медіанне значення для всіх пацієнтів. В дані, відображені на фігурі, були включені дані тільки для візитів з більш ніж 2 спостереженнями. На фіг. 4 показана відсоткова зміна абсолютного числа CD8⁺ Т-клітин (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) від вихідного рівня в периферичній крові протягом часу для кожного пацієнта. Чорною лінією на фігурі вказано медіанне значення для всіх пацієнтів. В дані, відображені на фігурі, були включені дані тільки для візитів з більш ніж 2 спостереженнями. Лінійне моделювання зі змішаними ефектами для
- 40

абсолютного числа клітин виявило в середньому підвищення загального числа Т-клітин (CD45⁺CD3⁺), що становить $0,13 \times 10^6$ клітин/мкл за лог-шкалою за кожні 100 днів (ДІ = 0,1, 0,15) після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Було виявлено, що число CD8⁺ Т-клітин значно зростало на $0,16 \times 10^6$ клітин/мкл за лог-шкалою за кожні 100 днів (ДІ = 0,13, 0,19).

5 Було виявлено, що число CD4⁺ Т-клітин помірно зростало на $0,11 \times 10^6$ клітин/мкл за лог-шкалою за кожні 100 днів (ДІ = 0,09, 0,13).

Кожна з субпопуляцій Т-клітин пацієнтів з відповіддю демонструвала більш високу максимальну відсоткову зміну абсолютного числа клітин від вихідного рівня, ніж такі субпопуляції пацієнтів без відповіді (CD3⁺ $p=3,2993e-05$; CD4⁺ $p=3,486e-05$; CD8⁺ $p=2,7172e-05$; регуляторні Т-клітини $p=0,002$). У таблиці 2 наведені результати знакового рангового критерію Уїлкоксона для порівняння кожної субпопуляції Т-клітин в периферійній крові пацієнтів з відповіддю й без відповіді для отримання відсоткової зміни абсолютного числа від вихідного рівня.

Таблиця 2

Відсоткова зміна абсолютного числа клітин; периферична кров					
Зразок	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	Р-значення *
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : В	33	86,76	118,91 (104,07)	(-16,1; 398,71)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : БВ	80	28,08	43,02 (69,55)	(-67,11; 286,67)	3,30 E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : В	33	72,08	77,74 (60,99)	(-21,05; 233,21)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : БВ	80	19,48	29,36 (59,58)	(-68; 298,89)	3,49 E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : В	33	106,6	180,81 (192,37)	(-7,07; 760,51)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : БВ	80	32,24	63,96 (112,44)	(-66,22; 588,89)	2,72 E-05
N: кількість зразків на групу					
В: пацієнт з відповіддю					
БВ: пацієнт без відповіді.					
* Пацієнт з відповіддю в порівнянні з пацієнтом без відповіді					
СВ: стандартне відхилення					

Аналогічним чином було виявлено, що загальна кількість Т-клітин (CD45⁺CD3⁺ у вигляді відсоткового вмісту лімфоцитів) і CD8⁺Т-клітин (CD45⁺CD3⁺CD8⁺ у вигляді відсоткового вмісту лімфоцитів) значно зросла під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) як у пацієнтів з відповіддю, так і в пацієнтів без відповіді (пацієнти з відповіддю на CD3⁺ $p=3,8147e-06$, без відповіді $p=9,8225e-05$; пацієнти з відповіддю на CD8⁺ $p=3,8147e-06$, без відповіді $p=0,0003$). Змін у медіанному значенні CD4⁺ Т-клітин в кістковому мозку в будь-якій групі з клінічною відповіддю не спостерігали. У таблиці 3 наведені результати знакового рангового критерію Уїлкоксона для різних Т-клітин у вигляді відсоткового вмісту лімфоцитів в кістковому мозку. На фіг. 5 показаний відсотковий вміст (%) клітин CD45⁺CD3⁺ протягом часу під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (в графік включені як пацієнти з відповіддю, так і пацієнти без відповіді). На фіг. 6 показаний відсотковий вміст клітин CD45⁺CD3⁺CD8⁺ протягом часу під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (в графік включені як пацієнти з відповіддю, так і пацієнти без відповіді).

Таблиця 3

Популяції Т-клітин (% лімфоцитів) в кістковому мозку					
Зразок		БВ: вихідний рівень	БВ: при лікуванні	В: вихідний рівень	В: при лікуванні
CD45 ⁺ CD3 ⁺ /лімфоцити	Ні	29	29	19	19
	Медіанне	72,2	83,6	77,9	91,4
	Середнє значення (СВ)	68,57 (13,64)	80,93 (11,57)	71,82 (14,92)	87,67 (9,49)
	Діапазон	(36,3; 94,5)	(50,9; 97,4)	(42,2; 94,8)	(63,3; 97,2)
	Р-значення*		9,8225e-05		3,8147e-06
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /лімфоцити	Ні	29	29	19	19
	Медіанне	33,7	29,2	22,7	22,8
	Середнє значення (СВ)	31,24 (12,14)	32,96 (12,57)	24,18 (7,37)	24,29 (9,58)
	Діапазон	(6,3; 54,2)	(9,6; 60,9)	(8,1; 36,6)	(12,5; 45,4)
	Р-значення*		0,18351		0,98432
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ /лімфоцити	Ні	29	29	19	19
	Медіанне	36,3	43,3	49,4	66,9
	Середнє значення (СВ)	37,39 (13,64)	47,74 (18,14)	46,91 (14,89)	62,82 (12,79)
	Діапазон	(15,9; 67,2)	(18,5; 81)	(24,5; 79,6)	(33,1; 83,3)
	Р-значення*		0,00026883		3,8147e-06
N: кількість зразків на групу					
В: пацієнт з відповіддю					
БВ: пацієнт без відповіді.					
* Порівняння вихідного рівня і рівня при лікуванні для груп пацієнтів з відповіддю й без відповіді					
СВ: стандартне відхилення					

Обидві групи пацієнтів - пацієнти з відповіддю ц пацієнти без відповіді - продемонстрували підвищення числа Т-клітин в периферійній крові та кістковому мозку, однак пацієнти з відповіддю мали найбільшу відсоткову зміну від вихідного рівня. Щоб зрозуміти, чи мають пацієнти з відповіддю або пацієнти без відповіді різні базові рівні Т-клітин CD3⁺, CD4⁺ та CD8⁺ перед лікуванням препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), порівнювали вимірювання даних периферичної крові на вихідному рівні для кожної підгрупи.

Статистично значуща різниця між пацієнтами з відповіддю на лікування й пацієнтами без відповіді при порівнянні абсолютного числа Т-клітин на вихідному рівні в периферичній крові (таблиця 4) або відсоткового вмісту Т-клітин в загальній кількості лімфоцитів в периферичній крові (таблиця 5), виконаного з використанням знакового рангового критерію Уїлкоксона, була відсутня.

Таблиця 4

Абсолютне число клітин в периферійній крові до лікування на вихідному рівні					
Зразок	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	Р-значення*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : В	33	574	715,91 (472,54)	(186; 2096)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : БВ	80	638	672,5 (426,36)	(85; 2407)	0,81527
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	190	276,91 (207,39)	(77; 1085)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : БВ	80	214	251,61 (146,13)	21; 766)	0,94965
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : В	33	332	424,55 (324,49)	(93; 1238)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : БВ	80	318	398,14 (354,52)	(43; 2221)	0,56555
N: кількість зразків на групу					
В: пацієнт з відповіддю					
БВ: пацієнт без відповіді.					
*порівняння пацієнтів з відповіддю з пацієнтами без відповіді за типом клітин					
СВ: стандартне відхилення					

Таблиця 5

Т-клітини (% лімфоцитів) в кістковому мозку до лікування					
Зразок	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	Р-значення
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	23	78,4	73,66 (14,43)	(42,2; 94,8)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : БВ	65	76,5	73,5 (13,93)	(36,3; 94,5)	0,81232
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : В	23	25	25,57 (8,32)	(8,1; 41,4)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : БВ	65	25,3	27,53 (12,76)	(6,3; 55,2)	0,76482
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : В	23	50	47,7 (13,73)	(24,5; 79,6)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : БВ	65	44,3	44,73 (15,49)	(15,9; 76,1)	0,41678
N: кількість зразків на групу					
В: пацієнт з відповіддю					
БВ: пацієнт без відповіді.					
*порівняння пацієнтів з відповіддю з пацієнтами без відповіді за типом клітин					
СВ: стандартне відхилення					

5

Регуляторні Т-клітини

Клітини Treg були визначені в зразку як популяція клітин CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Співвідношення між CD8⁺ Т-клітинами і Treg оцінювали у пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), в периферичній крові та кістковому мозку протягом часу. Співвідношення зросло як в периферичній крові, так і в кістковому мозку. На фіг. 7A наведені медіанні значення співвідношень клітин CD8⁺/Treg та CD8⁺/CD4⁺ в периферичній крові всіх пацієнтів для кожної точки часу. На фіг. 7B наведені медіанні значення співвідношень Т-клітин CD8⁺/Treg та CD8⁺/CD4⁺ в кістковому мозку всіх пацієнтів для кожної точки часу. Зміни в співвідношеннях абсолютного числа CD8⁺/Treg та CD8⁺/CD4⁺ в периферичній крові (таблиця 6) і в кістковому мозку (таблиця 7) під час лікування були істотними відповідно до знакового рангового критерію Уїлкоксона.

В аналізі об'єднаних даних дослідження SIRIUS і GEN501 (приклад 6), медіанне співвідношення клітин CD8⁺/CD4⁺ та CD8⁺/Treg у в периферичній крові було підвищено на 8 тиждень ($p = 5,1 \times 10^{-5}$ для CD8⁺/CD4⁺ та $p = 1,8 \times 10^{-7}$ для CD8⁺/Treg) і на 16 тиждень ($p = 0,00017$ для CD8⁺/CD4⁺ та $p = 4,1 \times 10^{-7}$ для CD8⁺/Treg). Аналогічно, в кістковому мозку медіанні співвідношення клітин CD8⁺/CD4⁺ та CD8⁺/Treg були підвищені при лікуванні (тиждень 12 + 1 цикл) в порівнянні з вихідним рівнем ($p = 0,00016$ для CD8⁺/CD4⁺ і $p = 2,8 \times 10^{-7}$ для CD8⁺/Treg). Між пацієнтами з відповіддю й без відповіді значної різниці не спостерігали.

Таблиця 6

Співвідношення Т-клітин в периферійній крові					
Зразок	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	Р-значення*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : вихідний рівень	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: вихідний рівень	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
*порівняно з вихідним рівнем N: кількість зразків на групу СВ: стандартне відхилення					

Таблиця 7

Співвідношення Т-клітин в кістковому мозку					
Зразок	Ні	Медіанне	Середнє значення (СВ)	Діапазон	Р-значення*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (лімфоцити): вихідний рівень	31	163,18	184,4 (129,5)	(32,58; 674,58)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (лімфоцити): при лікуванні	31	221,89	240,85 (155,57)	(30,38; 666,4)	0,0038599
CD8 ⁺ /Treg(лімфоцити): вихідний рівень	30	1219,58	1802,73 (1582,7)	(306,41; 7960)	
CD8 ⁺ /Treg(лімфоцити): при лікуванні	30	2273,56	3905,72 (4232,73)	(451,22; 20825)	3,15E-07
*порівняно з вихідним рівнем N: кількість зразків на групу СВ: стандартне відхилення					

5 Приклад 4. Дизайн дослідження (GEN501)

У дослідженні GEN501 (NCT00572488) оцінювали препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) як препарат монотерапії для пацієнтів з рефрактерною до двох різних схем лікування ММ (множинною мієломою). Виділення, обробку зразків і статистичний аналіз проводили, як описано в прикладі 1 і прикладі 2. Дослідження було описано в Lokhorst et al., N Eng J Med 373: 1207-19, 2005.

Скорочено, дослідження GEN501 було першим клінічним дослідженням препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) на людях у суб'єктів з ММ. Воно являє собою дослідження безпеки фази 1/2 з підвищенням дози, розділене на 2 частини. Частина 1 являє собою відкрите дослідження з підвищенням дози; Частина 2 являє собою відкрите неконтрольоване дослідження з декількома групами на підставі рівнів доз, встановлених в частині 1.

У частині 1 оцінювали 10 рівнів доз препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб): 0,005, 0,05, 0,10, 0,50, 1, 2, 4, 8, 16 і 24 мг/кг. У 2 групах з найменшою дозою було визначено по 1 (+3) суб'єкту в кожну, а стандартне визначення по 3 (+3) суб'єкта застосовували до решти 8 груп дозування. Частина 2 являла собою відкрите неконтрольоване дослідження, яке включало два рівня доз - 8 мг/кг і 16 мг/кг. Частина 1 включала 32 суб'єктів, а частина 2 включала 72 суб'єктів.

Приклад 5. Лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) індукує клональність Т-клітин у пацієнтів

Врахувавши на виявлене в дослідженні MY2002 розмноження CD8⁺ Т-клітин в периферичній крові і в кістковому мозку, проводили високоефективне секвенування нового покоління рецепторів Т-клітин (РТК) шляхом проведення аналізу ImmunoSeq™ для визначення того, чи є розмноження CD8⁺ Т-клітин за своєю природою клональним, що вказало б на наявність адаптивної імунної відповіді. Всього оцінювали 17 зразків пацієнтів від суб'єктів, включених в дослідження GEN501 (n = 6 пацієнтів з відповіддю, тобто ≥ ЧР; n = 11 пацієнтів без відповіді, тобто, МВ, СЗ, ПЗ).

Секвенування РТК виявило, що лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) значно підвищує клональність у всіх пацієнтів. На фіг. 8А показана кореляція між клональністю Т-клітин до і після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) ($p = 0,0056$). На фіг. 8В показана кратність змін клональності у окремих пацієнтів. Пацієнти з відповіддю відзначені зірочкою. Ці дані дозволяють припустити, що зазначене розмноження Т-клітин при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) може бути клональним за природою.

У пацієнтів з відповіддю спостерігалось більш значуще загальне розмноження в репертуарі РТК (згідно з даними зі зміни чисельності; ЗЧ) в порівнянні з пацієнтами без відповіді. На фіг. 8С показана відсоткова ЗЧ для окремих пацієнтів. Група А: пацієнти з відповіддю, група В: пацієнти без відповіді. Спостерігали статистично значущу різницю між пацієнтами з відповіддю і пацієнтами без відповіді ($p = 0,037$). На фіг. 8D показана сумарна абсолютна зміна чисельності (ЗЧ) у пацієнтів з відповіддю та пацієнтів без відповіді для кожного розмноженого Т-клітинного клону. На фіг. 8Е показана максимальна відсоткова ЗЧ для кожного окремого пацієнта. Група А: пацієнти з відповіддю, група В: пацієнти без відповіді. Спостерігали статистично значущу різницю між пацієнтами з відповіддю і пацієнтами без відповіді ($p = 0,048$). На фіг. 8F показана максимальна ЗЧ одного Т-клітинного клону в пацієнтів з відповіддю (група А) і пацієнтів без відповіді (група В).

ЗЧ отримували шляхом визначення значущої різниці в клональній чисельності між двома зразками, використовуючи точний критерій Фішера (DeWitt et al. J. Virol. 2015) і вираховуючи абсолютну зміну в чисельності для кожного розмноженого клону.

Приклад 6. Імуномодуюча дія препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) у пацієнтів, включених у дослідження GEN501

У пацієнтів з відповіддю й без відповіді, включених в дослідження GEN501, оцінювали різні популяції Т- і В-клітин.

Лімфоцити

Так само, як і в дослідженні SIRIUS (MMY2002), число лімфоцитів в периферичній крові й в кістковому мозку підвищувалось під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Це збільшення було пов'язано з підвищеним числом клітин CD4⁺ і CD8⁺.

Центральні клітини пам'яті CD8⁺

Т-клітинний фенотип CD8⁺ досліджували протягом часу в пацієнтів з підгрупи в 17 пацієнтів, включених у дослідження GEN 501, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Взяті в пацієнтів клітини CD8⁺ були визначені як наївні клітини (CD45RO⁻/CD62L⁺) (T_N) або центральні клітини пам'яті (T_{CM}) (CD45RO⁺/CD62L^{high}) за допомогою стандартних протоколів.

На фіг. 9А показаний відсоток наївних клітин CD8⁺ (% клітин CD8⁺), а на фіг. 9В показаний відсоток центральних клітин пам'яті CD8⁺. Лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) значно знижувало кількість наївних Т-клітин CD8⁺ ($p = 1,82 \times 10^{-4}$ на 8 тиждень) і підвищувало кількість Т-клітин пам'яті CD8⁺ ($p = 4,88 \times 10^{-2}$ на 8 тиждень). Такі дані дають можливість припустити наявність переходу від наївних цитотоксичних Т-клітин до Т-клітин пам'яті, які можуть бути активовані проти конкретного антигену. Білими квадратами позначені пацієнти, які досягли щонайменше мінімальної відповіді ($\geq$ MB), а чорними квадратами вказані пацієнти, які мали стабільне захворювання або прогресуюче захворювання. Більш значуще зниження числа наївних Т-клітин CD8⁺ було очевидним у пацієнтів, що відповідали на лікування (дані не показані). На фіг. 9С показано, що лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) підвищувало відсотковий вміст рестрикованих HLA класу I Т-клітин, які частково стимулюють вірус-специфічні і алореактивні Т-клітинні відповіді. На фіг. 9D показано, що ефекторні Т-клітини пам'яті, які розмножувались, експресували низькі рівні CD38. Слід відзначити, що такі Т-клітини виявляють нормальну і навіть підвищену функціональну активність проти вірусних пептидів і алоантигенів (див. приклад 8). На основі таких функціональних результатів ми зробили висновки, що існує розмноження або поліпшення активності антиген-наvcених Т-клітин проти вірусних пептидів і алоантигенів під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Ці дані дозволяють припустити, що, на відміну від регуляторних підгруп клітин, для належного функціонування та розмноження ефекторних Т-клітин не потрібна експресія CD38.

CD38-позитивні регуляторні Т-клітини

Спостереження інтенсивного розмноження і підвищення активності цитотоксичних Т-клітин, а також недавні літературні дані, які вказують на експресію CD38 деякими імуносупресивними клітинними підгрупами, підштовхнули до вивчення дії препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаба) на популяцію регуляторних Т-клітин (Treg), мієлоїдних супресорних клітин (MCK) і регуляторних В-клітин (Breg).

Регуляторні Т-клітини (Treg) (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) виділяли з використанням стандартних протоколів. Частоту появи Treg аналізували способом проточної цитометрії.

Субпопуляція периферичних Treg (10 % $\pm$ 10 %) експресувала високі рівні CD38 до активації Treg. На фіг. 10А, верхня панель, показана частота появи Treg в популяції клітин CD3⁺ CD4⁺ (популяція клітин Р4) на вихідному рівні. На фіг. 10А, нижня панель, показана підгрупа Treg з високою експресією CD38 (популяція клітин Р5). Такі CD38⁺ Treg були дуже чутливі до лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) і демонстрували значне і практично негайне зниження чисельності після першої дози препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (n = 17 пацієнтів; P = 8,88 $\times$ 10⁻¹⁶ на 1 тиждень у порівнянні з вихідним рівнем). Частота появи Treg після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) показана на фіг. 10В, верхня панель (популяція клітин Р4). На фіг. 10В, нижня панель, показано, що клітини CD38^{вис} Treg (клітини Р5) являли найбільш виснажену популяцію Treg після першого введення препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Такі клітини CD38⁺ Treg залишалися виснаженими під час лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (p = 8,88 $\times$ 10⁻¹⁶, 1,11 $\times$ 10⁻¹⁵ та 1,50 $\times$ 10⁻¹¹ на 1, 4 і 8 тижні відповідно в порівнянні з вихідним рівнем. На фіг. 10С показано відсоткове значення клітин CD38^{вис} Treg відносно загального числа клітин CD3⁺ на вихідному рівні, на 1 тиждень, 4 тиждень, 8 тиждень, в момент рецидиву і через 6 місяців після закінчення лікування (ЗЛ). На цей момент часу число клітин CD38^{вис} Treg поверталось до вихідного рівня. Зміни в CD38^{вис} Treg були однакові у пацієнтів, які відповідали і не відповідали на лікування, однак співвідношення CD8⁺ Т-клітини:Treg було значно вище на 8 тиждень у пацієнтів, які демонстрували відповідь на ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (P = 0,00955; фіг. 10D).

Для оцінки можливої біологічної значущості виснаження CD38⁺ Treg при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) оцінювали супресивну здатність CD38⁺ Treg в порівнянні з CD38⁻ Treg на аутологічних CD3⁺ Т-клітинах. У серії експериментів, в яких використовувалися зразки від декількох здорових донорів, клітини CD38⁺ Treg більш інтенсивно пригнічували проліферацію Т-клітин (спостережена проліферація клітин: 9,9 %), ніж клітини CD38⁻ Treg (спостережена проліферація клітин: 53,2 %) або негативний контроль (спостережена проліферація клітин: 74,9 %) (фіг. 10Е).

Оскільки в заморожених зразках МКПК нелегко виявити МСК, гранулоцитарні CD38⁺ МСК (CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD15⁺CD33⁺) були створені in vitro з МКПК, виділених з організму пацієнтів на вихідному рівні, та пацієнтів, які отримували одну інфузію препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). На фіг. 11 показана гістограма даних, отриманих шляхом проточної цитометрії виявлених МСК (фіг. 11, верхня гістограма, взята в рамку популяція клітин). Приблизно половина клітин МСК експресували CD38 (фіг. 11, середній графік; обведена колом популяція клітин Р7). Клітини CD38^{вис} МСК були практично виснажені у пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (фіг. 11, нижній графік; обведена колом популяція клітин Р7).

Неспецифічні МСК лінії диференціювання CD38^{вис} були виснажені після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) протягом часу як у пацієнтів без відповіді, так і у пацієнтів з щонайменше мінімальною відповіддю на лікування. На фіг. 12 показано, що відсотковий вміст клітин CD38^{вис} МСК було знижено практично до 0 % у пацієнтів на 1 тиждень, 4 тиждень або 8 тиждень лікування. Неспецифічні МСК лінії диференціювання CD38^{вис} повернулися до вихідного рівня після закінчення лікування.

Пацієнти з найбільшими популяціями CD38⁺ в межах лінії диференціювання неспецифічних МСК демонстрували найкращі й найбільш тривалі відповіді на лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). На фіг. 13 показано, що пацієнти 2, 4, 15, 16 і 17, які мають найбільший відсотковий вміст клітин CD38^{вис} МСК (як показано на фіг. 11), визначені як пацієнти з ЧВ або МВ, демонстрували виживаність без прогресування (ВБП) щонайменше 8 місяців.

Неспецифічні МСК лінії диференціювання CD38^{вис} були також чутливі до індукованої препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) АЗКЦ in vitro. Аналіз АЗКЦ проводили, використовуючи клітини CD38^{вис} МСК від двох донорів і клітини Дауді в якості контрольних клітин-мішеней зі співвідношенням ефекторні клітини:клітини-мішені 50:1. На фіг. 14 показані результати експерименту для одного донора. Препарат ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) індукував лізис клітин МСК.

Визначення клітин CD38⁺ Breg проводили у пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (n = 16) і, подібно до клітин CD38⁺ Treg, вони були виснажені після першої дози препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (p = 0,0018 на 1 тиждень у порівнянні з вихідним рівнем; парний рангові критерій Уїлкоксона) й залишалися на низькому рівні весь час під час лікування пацієнта (фіг. 15А). Відсортовані методом FACS клітини Breg при стимуляції виробляли IL-10 (фіг. 15В).

Разом ці спостереження дозволяють припустити, що виснаження імуносупресивних клітин CD38⁺ МСК, Breg і Treg є важливим механізмом, який має значний вплив на індуковані препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) зміни в популяціях і клональності Т-клітин.

Приклад 7. Клітини CD38⁺ МСК присутні в пацієнтів з онкологічними захворюваннями
5 Відсотковий вміст МСК (Lin-CD14-HLADR^{низ}) і їхню експресію CD38 досліджували способом проточної цитометрії в периферичній крові пацієнтів з НДКРЛ або раком простати.

Відсотковий вміст МСК становив приблизно 10-37 % і приблизно 10-27 % МКПК в аналізованих зразках від пацієнтів з НДКРЛ або раком простати відповідно. Експресія CD38 була виявлена в 80-100 % клітин Lin-CD14⁺HLADR^{низ} МСК з МКПК пацієнтів з НДКРЛ і в 70-100
10 % МСК з МКПК пацієнтів з раком простати.

Приклад 8. ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) підсилює противірусні Т-клітинні відповіді

Для додаткової оцінки дії препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) на активацію і функціональність Т-клітин, визначали вироблення IFN-γ у периферичних Т-клітин у відповідь на вірусні та алоантигенні впливи у пацієнтів, які отримували лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) (n = 7), з діапазоном клінічних результатів. Пацієнти з ЧВ або кращим
15 результатом лікування демонстрували значне підвищення секреції IFN-γ у відповідь на вірусні та алоантигенні впливи після лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) в порівнянні з вихідним рівнем щонайменше в один момент часу протягом лікування, що дозволяє припустити, що функція Т-клітин не порушується через низьку експресію CD38 (див. приклад 6, фіг. 9С).
20 Аналогічно даним клональності РТК, це підвищення було більш значним у пацієнтів, які відповідали на лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), ніж у тих, хто не відповідав. На фіг. 16А показана противірусна відповідь типового пацієнта з ДХЧР. На фіг. 16В показана противірусна відповідь типового пацієнта з ПР. На фіг. 16С показана противірусна відповідь типового пацієнта з ПЗ. На фіг. 16D показана противірусна відповідь типового
25 пацієнта з МВ. На фігурах планки похибок являють стандартну похибку середнього в подвійних культурах. Зірочка позначає статистично значущі зміни між зазначеними порівняннями. Показана найкраща відповідь на думку незалежного наглядового комітету. Відповідно до цих результатів, вірус-реактивні Т-клітини у пацієнтів з ДХЧР (фіг. 16Е) або ПР (фіг. 16F) демонстрували підвищення проліферативної здатності під час лікування препаратом
30 ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб).

Приклад 9. Механізм чутливості CD38-експресуючих підтипів імунних клітин до препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб)

Дані обох досліджень, GEN501 і SIRIUS, свідчать про виснаження деяких імунних клітин, які експресують CD38 (НК-клітини, регуляторні Т-клітини (Treg), регуляторні В-клітини (Breg) і мієлоїдні супресорні клітини (МСК)), в той час як кількість інших клітин, які експресують CD38, збільшується (цитотоксичні і хелперні Т-клітини) при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб).
35

Для розуміння механізму чутливості оцінювали рівні експресії CD38 в різних субпопуляціях імунних клітин у здорових донорів і пацієнтів з множинною мієломою, включених в дослідження GEN501 або SIRIUS. На фіг. 17А приведена гістограма експресії CD38 в імунних клітинах
40 здорового донора, а на фіг. 17В приведена гістограма експресії CD38 в імунних клітинах пацієнта з множинною мієломою. У здорового донора експресія CD38 була найбільшою в НК-клітинах, потім - в моноцитах, В- і Т-клітинах. У пацієнта з множинною мієломою експресія CD38 була найбільшою в плазматичних клітинах, потім - в підгрупі В-клітин, НК-клітинах, моноцитах,
45 В-клітинах і Т-клітинах. На фіг. 17С наведено порівняння середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) CD38 в наступних клітинах: НК-клітини, Treg, Breg, В- і Т-клітини, взятих від пацієнтів з рецидивною та рефрактерною мієломою, яке демонструє, що, після плазматичних клітин, НК-клітини експресували найвищі рівні CD38, потім - регуляторні Т-клітини (Treg) і регуляторні В-клітини (Breg).

На додачу до експресії CD38, інші білки клітинної поверхні, наприклад, інгібіторні білки комплементу (C1P; CD46, CD55, CD59), можуть теж впливати на чутливість або стійкість до препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Виконана in vitro оцінка C1P всіх субпопуляцій імунних клітин дозволила виявити, що НК-клітини експресують дуже низькі рівні CD59 і CD55, тоді як інші популяції Т- і В-клітин експресують набагато більші рівні. Це також може впливати на
50 варіабельність чутливості до препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) серед підтипів імунних клітин (дані не показані).
55

Обговорення

У цьому дослідженні описано раніше невідому імуномодуючу дію препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), а саме - зниження популяцій імуносупресивних клітин CD38⁺ з
60 одночасною індукцією розмноження хелперних і цитотоксичних Т-клітин, виробленням IFN-γ у

відповідь на вірусні пептиди і підвищення клональності РТК, що свідчить про поліпшення адаптивної імунної відповіді.

Це дослідження демонструє, що клітини МСК і Трег експресують CD38 і є сприйнятливими до лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Відомо, що ці клітини присутні в пухлинному мікрооточенні й беруть участь у зростанні пухлини, імунній евазії, ангиогенезі, метастазуванні і виробленні супресивних цитокінів. Крім цих супресивних підгруп клітин CD38 + була виявлена нова субпопуляція регуляторних Т-клітин (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}), які також експресують високі рівні CD38 і демонструють видатну аутологічну Т-клітинну супресивну здатність. Ці клітини також були чутливі до препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), а їхнє число значно знижувалось у пацієнтів, які отримували лікування. Опосередковане препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) знищення таких імунорегуляторних клітин CD38⁺ може знизити локальну імунну супресію в мікрооточенні мієломи й зробити можливим розмноження позитивних імунних ефекторних клітин для забезпечення протипухлинної відповіді.

Дійсно, спостерігали значне розмноження деяких популяцій Т-клітин, включаючи CD4⁺ і CD8⁺, як в периферичній крові, так і в кістковому мозку (тобто, в пухлині). Специфічні субпопуляції CD8⁺ були змінені внаслідок терапії препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), що включало значне зниження числа наївних Т-клітин і супутнє йому значне підвищення числа ефекторних Т-клітин пам'яті CD8⁺, що вказує на зсув в ефекторних Т-клітинах в напрямку навченого антигеном фенотипу, який зберігає імунологічну пам'ять і може бути реактивним проти пухлинних антигенів. Співвідношення CD8⁺: CD4⁺ та CD8⁺:Трег також значно зростали при лікуванні, демонструючи зрушення в бік позитивних імунних регуляторів у порівнянні з негативними.

Щоб оцінити, чи мали розмножені Т-клітини CD4⁺ і CD8⁺ клональну природу, досліджували репертуар Т-клітин в підгрупі пацієнтів. Клональність Т-клітин значно зростала при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) навіть у пацієнтів, у яких найкращою спостереженою відповіддю було С3 або прогресування. Отже, підвищення клональності Т-клітин не може відбуватися виключно внаслідок зниження пухлинного навантаження. При цьому відхилення в клональності Т-клітин було значним у пацієнтів з позитивною клінічною відповіддю і корелювало з підвищенням числа Т-клітин CD8⁺, що дозволяє припустити, що спостережуване розмноження Т-клітин при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) було стимульоване антигенами. Це особливо помітно в цій популяції пацієнтів, які пройшли інтенсивне попереднє лікування (в середньому 5 попередніх ліній терапії), і не очікувалося, що вони зможуть показати сильну протипухлинну імунну відповідь. Крім підвищення клональності РТК, пацієнти з відповіддю на ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) демонстрували підвищені Т-клітинні відповіді на попередньо існуючі вірусні пептиди і алоантигени, що дозволяє припустити вихід імунної системи з імуносупресивної стану.

Лікування препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) призводило до зниження кількості імуносупресивних МСК і регуляторних Т-і В-клітин. Це зниження відбувалося одночасно з розмноженням Т-хелперних клітин CD4⁺ і цитотоксичних Т-клітин CD8⁺. Т-клітинна клональність і функціональні протівірусні відповіді, які визначаються за вироблення IFN-γ, також зростали при лікуванні препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб). Такі спостереження свідчать про те, що Т-клітини продовжували функціонувати належним чином незважаючи на низьку експресію CD38, і дозволяють припустити, що підвищення Т-клітинної відповіді може відбуватися внаслідок виснаження регуляторних клітин. Крім того, такі зміни в розмноженні, активності і клональності Т-клітин були яскравіше виражені у пацієнтів, сприйнятливих до препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб), в порівнянні з несприйнятливими. Рецидив після терапії препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) був пов'язаний з оборотним характером багатьох з цих змін. Це дозволяє припустити додатковий, раніше невивчений механізм дії препарату ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) шляхом імуномодуляції, який може вносити свій вклад в імунні відповіді та їхню ефективність.

Нещодавно продемонстрували свою ефективність в ряді випадків антитіла, які стимулюють протипухлинні імунні відповіді замість прямого націлювання на онкологічні новоутворення. Антитіла, що інгібують CTLA-4 і PD-1, стимулюють розмноження Т-клітин і підсилюють активацію Т-клітин, що призводить до подовження виживання й уповільнення повторної появи захворювання у пацієнтів з пізньою стадією солідних пухлин і гематологічними злоякісними утвореннями, такими як лімфома Ходжкіна. Шляхом підвищення протиракового імунітету, ці імуномодулюючі антитіла можуть не тільки індукувати клінічні відповіді, але також запобігати повторній появі захворювання.

Приклад 10. Протеомний аналіз сироватки суб'єктів з множинною мієломою, які отримували монотерапію препаратом ДАРЗАЛЕКС™ (даратумумаб) в частині 2 клінічного дослідження 54767414MMY2002 (SIRIUS)

Збір та обробка зразків біомаркерів

Зразки периферичної крові збирали в стандартні пробірки для відділення сироватки (від 2,5 мл до 5 мл) і аліквоти сироватки перевозили замороженими (SomaLogic, Inc, Boulder, CO) для мультианалітичного профілювання сироваткового білка.

Профілювання сироваткового білка проводили на обладнанні компанії SomaLogic, застосовуючи раніше валідований аналіз SOMAscan, в якому проводиться вимір 1129 білкових аналітів із застосуванням афінних молекул SOMAmer. Реагенти SOMAmer являють собою білкові афінні реагенти на основі одноланцюгової ДНК. В аналізі використовуються невеликі кількості зразка (150 мкл плазми) і відбувається перетворення білкового сигналу в сигнал SOMAmer, який кількісно визначають за допомогою звичайної мікроматриці ДНК.

Кожен реагент SOMAmer містить 4 функціональних компоненти.

1. Унікальну послідовність розпізнавання білка
2. Біотин для захоплення
3. Фоторозщеплюваний лінкер
4. Флуоресцентну молекулу для виявлення

В унікальну послідовність розпізнавання білка, в якій використовується ДНК, вбудовані хімічно модифіковані нуклеотиди, які імітують амінокислотні бічні ланцюги, розширюючи різноманітність стандартних аптамерів і підвищуючи специфічність і афінність взаємодій білок-нуклеїнова кислота (Gold et al., PLoS One 5: e15004, 2010). Аптамери вибираються за технікою SELEX. Реагенти SOMAmer вибирають, використовуючи білки в їх нативній конформації. Отже, реагентів SOMAmer потребують інтактних третинних білкових структур для зв'язування. Реагенти SOMAmer не виявлять незгорнуті або денатуровані імовірно неактивні білки.

Майстер-мікси реагентів SOMAmer групують за типом зразка та розведення. Перед інкубацією зразка реагенти пов'язують зі стрептавідиновими гранулами. Білки в зразках пов'язують з когнатними реагентами SOMAmer в стані рівноваги, промивають, інкубують з NHS-біотином, промивають, а потім гранули піддають дії УФ-випромінювання для відщеплення фоторозщеплюваного лінкеру. Елюат містить реагенти SOMAmer, пов'язані з відповідними міченими біотином білками. Стрептавідинове захоплення і наступні промивання видаляють незв'язані реагенти SOMAmer. Під час остаточного елювання молекули SOMAmer звільняються від відповідних когнатних білків з застосуванням денатуруючих умов. Отриманий елюат гібридизують до стандартних ДНК-мікроматриць Agilent, а флуорофор з молекул SOMAmer кількісно визначають в відносних одиницях флуоресценції (ВОФ). ВОФ пропорційно кількості білка в зразку.

Зразки з дослідження MMY2002 досліджували в двох первинних партіях. Перша партія зі 180 зразків містила спарені зразки сироватки від 90 суб'єктів для циклу 1 дня 1 (C1D1, вихідний рівень) і C3D1 (цикл 3 день 1). 180 зразків аналізували разом в трьох окремих планшетах SomaScan. Друга партія зразків містила 50 C1D1 зразків, включаючи 35 повторних зразків з партії 1.

Аналіз даних

Вхідні дані та визначення

В аналіз були включені дані всіх суб'єктів, що проходили лікування та показували відповідь, що піддавалась оцінці. Відповідно до тексту звіту, пацієнти з відповіддю визначаються як суб'єкти з найкращою загальною відповіддю (відповідно до ННК в MMY2002) сПР, ДХЧР і ЧР, суб'єкти зі стабільним захворюванням (СЗ) як суб'єкти з мінімальною відповіддю (МВ) або СЗ, а пацієнти без відповіді визначаються як суб'єкти з найкращою загальною відповіддю (відповідно до ННК в MMY2002) прогресуючого захворювання (ПЗ).

Попередня обробка даних Somalogic

Вирівнювання партій

Партії 1 і 2 зразків MMY2002 досліджували на двох різних версіях платформи SOMAscan. Різниця між версіями була мінімальною і включала три послідовності SOMAmer, які різнилися між версіями (CTSE: 3594-6_1 -> 3594-6_5, FCN1: 3613-62_1 -> 3613-62_5, BMPER: 3654-27_1 -> 3654-27_4). Їх було виключено з аналізу.

Вимірювання для трьох планшетів партії 1 вирівнювали відповідно до стандартного процесу міжпланшетного калібрування SomaLogic шляхом визначення калібрувальних коефіцієнтів масштабування для планшета для кожного реагенту SOMAmer шляхом розрахунку співвідношення між спеціальним глобальним еталонним значенням для майстер-міксу та медіанного значенням 7 внутрішньопланшетних контрольних калібрувальних вимірювань.

Коефіцієнт масштабування для планшета для кожного реагенту SOMAmer однаково застосовували до кожного зразка в планшеті.

З огляду на різні версії платформи SOMAscan для партій 1 і 2 проводили систематичну міжпартійну корекцію варіабельності з модифікованим застосуванням стандартного процесу міжпланшетного калібрування SomaLogic шляхом максимального використання повторного вимірювання по 35 зразків для партій. Для кожного SOMAmer розраховували співвідношення між післякалібрувальним вимірюванням для партії 1 і докалібрувальним вимірюванням для партії 2 для кожного з 35 повторних зразків ($r_{i,j}$). Медіанне значення, отримане для цих 35 співвідношень, використовували для визначення скоригованого SOMAmer-специфічного калібрувального коефіцієнта масштабування для зразків партії 2. Потім ці калібрувальні коефіцієнти масштабування використовували аналогічним чином в стандартній процедурі SOMAscan.

$$r_{i,j} = \left(\frac{\text{Post-Calib. Conc}_{\text{Batch 1},i,j}}{\text{Pre-Calib. Conc}_{\text{Batch 2},i,j}} \right), \quad \bar{r}_i = (r_{i,1}, r_{i,2}, \dots, r_{i,j}) \quad \text{для всіх повторюваних зразків } j$$

Калібрувальний коефіцієнт масштабування_i = медіана ($\bar{r}_i$) = $\tilde{r}_i$

Після розрахунку скоригованих калібрувальних коефіцієнтів масштабування, розподіл всіх коефіцієнтів масштабування для кожної партії в аналізі наносили на графік для оцінки наявності викидів. 9 SOMAmer з дуже великими або маленькими калібраторами ($> 0,25$ і < 3) виключили з аналізу внаслідок поганої відтворюваності.

Після завершення вирівнювання партії й фільтрування SOMAmer для MMY2002, до всіх значень концентрації білка в MMY2002 застосовували $\log_2$ -перетворення для більшої відповідності даних нормальному розподілу й для поліпшення ефективності параметричних статистичних критеріїв.

Корекція фактору спотворення

Оцінку частини варіації набору даних, що пояснюється мета-змінними (демографія, клас відповіді і момент часу забору зразка), і визначення потенційних факторів спотворення проводили за допомогою аналізу основних компонентів з використанням центрованого й масштабованого набору даних. Використовували прості лінійні моделі для визначення найвищого ранжованого РС, який був істотно пов'язаний з кожною з досліджуваних змінних. Значимість цих зв'язків визначали з використанням критерію Вальда, а частину варіабельності РС, що пояснюється моделлю, оцінювали за R^2 апроксимації. Для даних MMY2002 було виявлено, що місце розташування корелює з PC1 і пояснює найбільшу частину варіабельності набору даних ($\geq 7,37$ %, p -значення = $3,71 \times 10^{-9}$). Для зниження впливу ефектів, пов'язаних з місцем отримання зразка, в межах даних, використовували ComBat28 для корекції ефектів розташування.

Повторне об'єднання зразків

Дані 35 зразків, повторювані для партій 1 і 2 MMY2002, об'єднували, розраховуючи середнє значення для кожного білка.

Аналіз диференційної концентрації білка

Співвідношення у пацієнтів з відповіддю та пацієнтів без відповіді.

Статистичне порівняння розподілу концентрації білка у пацієнтів з відповіддю на препарат ДАРЗАЛЕКСТМ (даратумумаб) в порівнянні з пацієнтами без відповіді проводили для вихідного рівня й під час лікування з використанням двох комплементарних способів: (i) критерій суми рангів Уїлкоксона (Hollander and Wolfe, *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons. 1973. 27-33 (один зразок), 68-75 (два зразка) для кожного окремого SOMAmer і (ii) аналіз Лімма (Ritchie, M.E., et al., *Nucleic Acids Res.* 2015; 20:43 (7): e47) для всіх SOMAmer одночасно. Все p -значення коректували, використовуючи метод Бенджаміна-Хохберг (BH) для корекції множинних гіпотез (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). Нульову гіпотезу за відсутності диференціальної експресії відкидали при скоригованому p -значенні $< 0,05$.

Лікування в порівнянні з вихідним рівнем

Базові рівні білка й рівні при лікуванні порівнювали, використовуючи три альтернативних статистичних способи: (i) двофакторний дисперсійний аналіз повторних вимірів ANOVA6 (ii) знаковий ранговий критерій Уїлкоксона й (iii) критерій Фрідмана (Johnson et al., (2007) *Biostatistics* 8 (1): 118-127). Все p -значення коригували щодо контрольного FDR, використовуючи метод BH для корекції множинних гіпотез (Benjamini and Hochberg, *J.R. Statist. Soc. B.57*: 289-300, 1995). Крім значущості лікування також застосовували двофакторний дисперсійний аналіз

повторних вимірювань ANOVA (Chambers et al., Analysis of variance; designed experiments: Частина 5: Statistical Models in S, Editors J.M Chambers and T.J Hastie. Wadsworth & Brookes / Cole. 1992) для визначення виникнення значного взаємозв'язку моменту часу й класу відповіді для кожного SOMAmer. Модифікований критерій суми рангів Уїлкоксона застосовували в якості ретроспективного аналізу для визначення того, чи демонстрували пацієнти з відповіддю й без відповіді різні ефекти від лікування, шляхом розрахунку різниці між значеннями концентрації білка при лікуванні й базової (наявної на вихідному рівні) концентрації білка у кожного суб'єкта та застосовуючи критерій суми рангів Уїлкоксона. Величини значимості коригували з використанням способу BH, а нульову гіпотезу відкидали при скоригованому р-значенні $<0,05$.

Навчання класифікатора

Дані за вихідним рівнем білка MMY2002 використовували для побудови класифікатора прогнозування відповіді. Підхід з вкладеними циклами і стратифікованою 10-кратною перехресною валідацією повторювали 30 разів, використовуючи 4 різних алгоритми машинного навчання: машини опорних векторів (МОВ), випадковий ліс (ВЛ), наївний баєсів класифікатор (НБ) і дерево рішень j48. Для кожного алгоритму навчання процедура підготовки починалася зі створення 10 збалансованих груп набору даних (зовнішній цикл). Одну з цих груп виключали як групу, що тестується, а інші 9 залишали й переводили на внутрішній цикл в якості групи навчання. У межах внутрішнього циклу групу навчання ще раз розбивали на 10 збалансованих груп, створюючи внутрішні набори навчання й тестування. Алгоритми навчання тренували на кожному з цих внутрішніх наборів навчання й повторювали цей процес 30 разів для кожної групи в межах зовнішнього циклу. Точність кожного алгоритму навчання внутрішнього циклу в прогнозуванні внутрішніх тестових наборів використовували для вибору характеристик і оптимізації параметрів моделі. Після завершення 30 внутрішніх процедур, у кожній групі навчання оцінювали ефективність зовнішнього циклу (використовуючи оптимізовані параметри і характеристики) для кожної відповідної групи, що тестується. Після цього всю процедуру зовнішнього циклу повторювали 30 разів, отримуючи 30 прогнозів відповіді для кожного зразка в межах набору даних. Статистичні дані ППК, чутливості і специфічності, отримані з використанням такого циклічного підходу, були апроксимацією того, наскільки добре кінцева модель, навчена за повним вихідним набором даних, буде працювати з новими досліджуваними випадками.

Результати дослідження MMY2002

Проводили різні порівняння, включаючи зміни в білкової експресії в залежності від індукованої лікуванням відповіді. Одним з білків, який продемонстрував зниження експресії з часом у пацієнтів з відповіддю, був PD-L1, тоді як експресія білка PD-L1 зростала з часом у пацієнтів без відповіді. Залучення PD-L1 на Т-клітинах призводить до зниження функції Т-клітин і підвищенню розвитку Treg. На фіг. 18 наведено профіль експресії білка PD-L1 у пацієнтів з відповіддю, без відповіді і у пацієнтів зі стабільним захворюванням під час циклу 1 і циклу 3.

Залучення PD-L1 з його рецептором PD-1 пригнічує протипухлинні відповіді й стимулює відсутність реакцій і виснаження Т-клітин. Не бажаючи бути пов'язаними будь-якої конкретної теорією, припустимо, що зниження регуляція PD-L1 після обробки CD38 також може призводити до посилення протипухлинних імунних відповідей в солідних пухлинах.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.

Ahmadi, Tahamtan

Casneuf, Tineke

Lokhorst, Henk

Mutis, Tuna

Sasser, Amy

<120> Імунна модуляція та лікування солідних пухлин з використанням антитіл,

що специфічно зв'язують CD38

<130> JBI5067WOPCT

5 <140> Перевідступлення прав

<141> 24.06.2016

<150> 62/331489

<151> 2016-05-04

10

<150> 62/263307

<151> 2015-12-04

<150> 62/250566

15

<151> 2015-11-04

<150> 62/249546

<151> 2015-11-02

20

<150> 62/184018

<151> 2015-06-24

<160> 40

25

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys

1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val

5 20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln

35 40 45

10

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu

50 55 60

15

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val

65 70 75 80

20

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys

85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu

25 100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile

115 120 125

30

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr

130 135 140

	Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Asp	Asp	Leu	Thr	Trp	Cys
	145			150			155			160						
5																
	Gly	Glu	Phe	Asn	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Tyr	Gln	Ser	Cys	Pro	Asp	Trp
			165				170			175						
10																
	Arg	Lys	Asp	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Phe	Trp	Lys	Thr	Val
		180				185			190							
15																
	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Val	Val	His	Val	Met	Leu
		195				200			205							
20																
	Asn	Gly	Ser	Arg	Ser	Lys	Ile	Phe	Asp	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Gly	Ser
		210				215			220							
25																
	Val	Glu	Val	His	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Val	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala
	225			230			235			240						
30																
	Trp	Val	Ile	His	Gly	Gly	Arg	Glu	Asp	Ser	Arg	Asp	Leu	Cys	Gln	Asp
			245				250			255						
35																
	Pro	Thr	Ile	Lys	Glu	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Ser	Lys	Arg	Asn	Ile	Gln
		260				265				270						

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
 275 280 285

5 Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
 290 295 300

<210> 2
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 15
 Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg
 1 5 10

20 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 3
 Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly
 1 5 10

30
 <210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH антитіла до CD38

5 <400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

15

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

20

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

25

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

30

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

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> VL антитіла до CD38

<400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

25 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 6
10 <211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> HCDR1 антитіла до CD38

<400> 6

Ser Phe Ala Met Ser
20 1 5

<210> 7
<211> 17
25 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HCDR2 антитіла до CD38

30 <400> 7

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR3 антитіла до CD38

15 <400> 8

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr

1 5 10

20

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

25

<220>

<223> LCDR1 антитіла до CD38

<400> 9

30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

	<210> 10
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Штучна послідовність
5	
	<220>
	<223> LCDR2 антитіла до CD38
	<400> 10
10	
	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
	1 5
15	<210> 11
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Штучна послідовність
20	<220>
	<223> LCDR3 антитіла до CD38
	<400> 11
25	Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe
	1 5 10
30	<210> 12
	<211> 452
	<212> PRT
	<213> Штучна послідовність
	<220>

<223> Важкий ланцюг антитіла до CD38

<400> 12

5	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
	1 5 10 15
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
	20 25 30
15	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35 40 45
20	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
	50 55 60
25	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
	65 70 75 80
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
	85 90 95
	Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
	100 105 110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
	115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

5

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

10

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

15

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

20

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

25

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

30

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
	260 265 270
5	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
	275 280 285
10	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
	290 295 300
15	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
	305 310 315 320
20	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
	325 330 335
25	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
	340 345 350
30	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
	355 360 365
35	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
	370 375 380
40	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
	385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

5

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

10

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

15

Ser Pro Gly Lys
 450

20

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25

<220>
 <223> Легкий ланцюг антитіла до CD38

<400> 13

30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

5

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

15

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

20

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

25

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

30

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

5 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

10 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

15

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

20 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH антитіла до CD38 003

25 <400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

30

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

Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

5 Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

10 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

20 Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

25 <210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> VL антитіла до CD38 003

<400> 15

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
	1 5 10 15
5	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
	20 25 30
10	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
	35 40 45
15	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
	50 55 60
20	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
	65 70 75 80
25	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
	85 90 95
30	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
	100 105
	<210> 16
	<211> 122
	<212> PRT
	<213> Штучна послідовність
	<220>

<223> VH антитіла до CD38 024

<400> 16

5	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
	1 5 10 15
10	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
	20 25 30
15	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
	35 40 45
20	Gly Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
	50 55 60
25	Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
	65 70 75 80
30	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
	85 90 95
30	Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
	100 105 110
30	Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
	115 120

5 <210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> VL антитіла до CD38 024
 10
 <400> 17

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

5

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH антитіла до CD38 MOR202

15

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

25

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Asp Pro Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

30

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

5

Ala Arg Asp Leu Pro Leu Val Tyr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

10

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

15

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> VL антитіла до CD38 MOR202

<400> 19

25

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val

30

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 5

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

10

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

15

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

<210> 20
 20 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 25 <223> VH МАТ до CD38 ізатуксимаб

<400> 20

30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

5

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

10

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

15

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

20

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

25

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

30

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL MAT до CD38 ізатуксимумаб

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

5

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

10

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

15

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

20

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

25

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

30

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH МАТ до PD-1 Кейтруда

5 <400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

10

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

15

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

20

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

25

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

30

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

5

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> VL MAT до PD-1 Кейтруда

<400> 23

15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20

20

25

30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35

40

45

25

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50

55

60

30

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

5 Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 24

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> VH МАТ до PD-1 Опдиво

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

20 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

25

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

30

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

10 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

15

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

20 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL MAT до PD-1 Опдиво

25 <400> 25

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

30

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

5 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

15 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25

<220>
 <223> VH МАТ до PD-L1 дурвалумаб

<400> 26

30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

5 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

10 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

20 Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

25 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30 <210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL MAT до PD-L1 дурвалумаб

<400> 27

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

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223> VH МАТ до PD-L1 атезолізумаб

<400> 28

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

15

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

20

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

5

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

10

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL MAT до PD-L1 атезолізумаб

15

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

20

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20

25

30

25

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

30

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

5

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

15

<220>
<223> VH МАТ до PD-L1 авелумаб

<400> 30

20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

25

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

30

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

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

5

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

10

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

15

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20

<210> 31
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

25

<220>
<223> VL MAT до PD-L1 авелумаб

<400> 31

30

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

5

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

10

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

15

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

20

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

25

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

30

<220>
<223> VH MAT до PD-1

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

5

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

10

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

15

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

20

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

25

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr
100 105 110

30

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

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL MAT до PD-1

5 <400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

10

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr

20 25 30

15

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

20

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

25

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu

85 90 95

30

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

5

<220>

<223> VH MAT до PD-1

<400> 34

10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val

20

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val

50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

30

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

5 Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
10 <211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> VH MAT до PD-1

<400> 35

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
20 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr
25 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

30 Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

5 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 117
15 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH MAT до TIM-3

20 <400> 36

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

30 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

15 Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

20

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

25

<220>
<223> VL MAT до TIM-3

<400> 37

30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asp Tyr
20 25 30

5 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

10 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

20 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gly His Ala Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

25 <210> 38
<211> 124
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> VH MAT до TIM-3

<400> 38

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1		5			10			15							
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20			25			30							
10	Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35			40			45							
15	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Asn	Phe
			50			55			60							
20	Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
			65			70			75					80		
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
						85			90					95		
30	Ala	Arg	Trp	Glu	Lys	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Phe	Asp
						100			105					110		
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
						115			120							
	<210> 39															
	<211> 106															

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223> VL MAT до TIM-3

<400> 39

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

15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

20 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

25 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 40
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Рекомбінантна гіалуронідаза
 10

 <400> 40

 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 15

 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

 20

 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

 25

 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60

 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 30 65 70 75 80

 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95

	Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
	100 105 110
5	
	Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
	115 120 125
10	
	Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
	130 135 140
15	
	Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
	145 150 155 160
20	
	Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
	165 170 175
25	
	Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
	180 185 190
30	
	Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
	195 200 205
35	
	Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
	210 215 220

Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240

5 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255

10 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270

15 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285

Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300

20 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320

25 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335

30 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365

Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380

5

Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400

10

Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415

15

Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430

20

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445

25

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460

30

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480

Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495

Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu

500

505

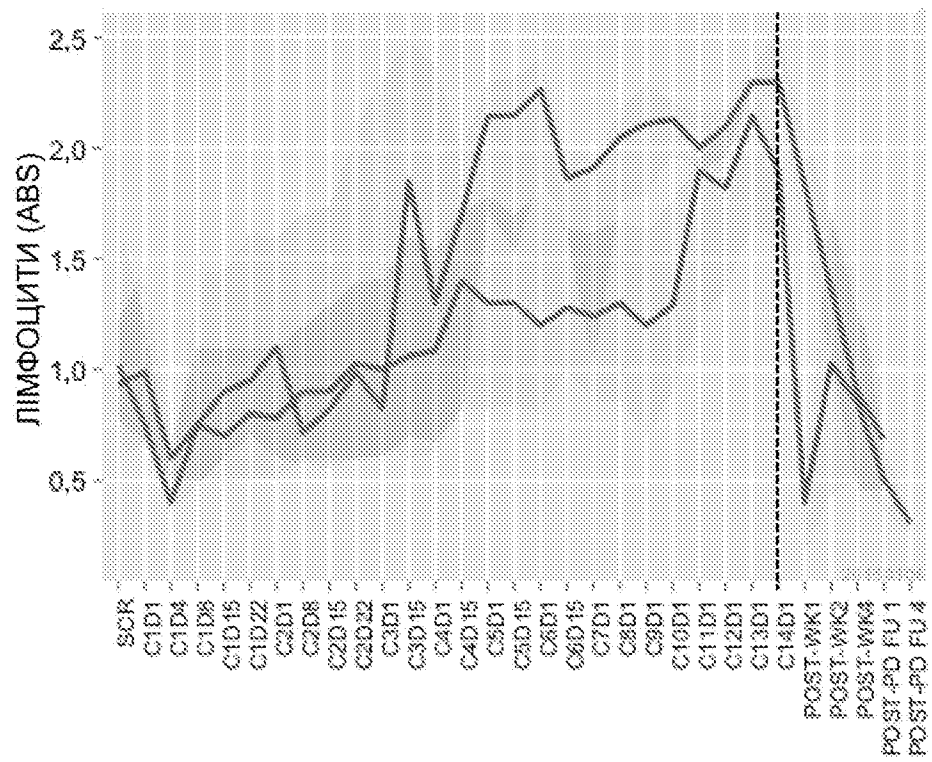
5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

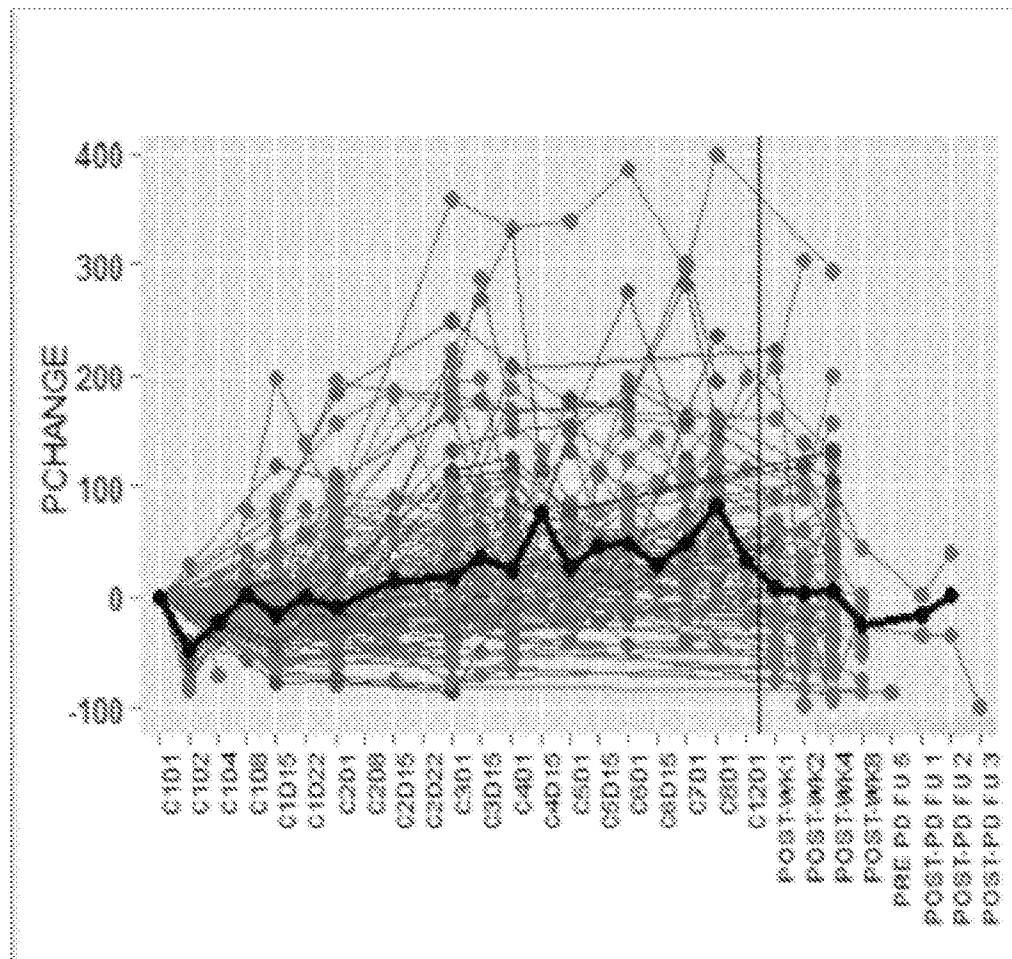
1. Спосіб підвищення імунної відповіді у пацієнта, який цього потребує, що включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з CD38, де
- 10 антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.
2. Спосіб за п. 1, де імунна відповідь є відповіддю ефекторних Т-клітин (Teff).
3. Спосіб за п. 2, де відповідь Teff опосередкована CD4⁺ Т-клітинами або CD8⁺ Т-клітинами.
4. Спосіб за п. 3, де відповідь Teff опосередкована CD8⁺ Т-клітинами.
- 15 5. Спосіб за п. 2, де відповідь Teff полягає в підвищенні числа CD8⁺ Т-клітин, підвищенні проліферації CD8⁺ Т-клітин, підвищенні клонального розмноження Т-клітин, підвищенні утворення клітин пам'яті CD8⁺, підвищенні антигензалежного вироблення антитіл, підвищенні вироблення цитокінів, підвищенні вироблення хемокінів або підвищенні вироблення інтерлейкінів.
- 20 6. Спосіб за п. 1 або 2, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, пригнічує функцію імуносупресорної клітини.
7. Спосіб за п. 6, де імуносупресорна клітина являє собою регуляторну Т-клітину (Treg).
8. Спосіб за п. 7, де Treg є CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Т-клітиною.
9. Спосіб за п. 8, де Treg експресує CD38.
- 25 10. Спосіб за п. 9, де функція Treg пригнічується через знищення Treg.
11. Спосіб за п. 10, де знищення Treg опосередковано антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (АЗКЦ).
12. Спосіб за п. 6, де імуносупресорна клітина являє собою мієлоїдну супресорну клітину (МСК).
13. Спосіб за п. 12, де МСК являє собою клітину CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺.
- 30 14. Спосіб за п. 13, де клітина CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺ експресує CD38.
15. Спосіб за п. 14, де функція МСК пригнічується через знищення МСК.
16. Спосіб за п. 15, де знищення МСК опосередковано АЗКЦ.
17. Спосіб за п. 6, де імуносупресорна клітина являє собою регуляторну В-клітину (Breg).
18. Спосіб за п. 17, де Breg є клітиною CD19⁺CD24⁺CD38⁺.
- 35 19. Спосіб за п. 18, де функція Breg пригнічується через знищення Breg.
20. Спосіб за п. 19, де знищення Breg опосередковано АЗКЦ.
21. Спосіб за п. 6, де імуносупресорна клітина знаходиться в кістковому мозку або периферичній крові.
22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-21, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, являє собою
- 40 неагоністичне антитіло.
23. Спосіб за п. 22, де неагоністичне антитіло індукує проліферацію зразка моноклеарних клітин периферичної крові *in vitro* статистично незначним чином.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга із SEQ ID NO: 12 і амінокислотну послідовність
- 45 легкого ланцюга із SEQ ID NO: 13.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-24, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, вводять у комбінації з другим терапевтичним агентом.
26. Спосіб за п. 25, де другий терапевтичний агент являє собою хімотерапевтичний агент, націлену протиракову терапію, стандартний лікарський препарат для лікування солідних пухлин
- 50 або інгібітор контрольних точок імунної відповіді.
27. Спосіб за п. 26, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-1, антитіло до PD-L1, антитіло до PD-L2, антитіло до LAG3, антитіло до TIM-3 або антитіло до CTLA-4.
28. Спосіб за п. 27, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-1.
- 55 29. Спосіб за п. 28, де антитіло до PD-1 містить
 - а) VH із SEQ ID NO: 22 і VL із SEQ ID NO: 23;
 - б) VH із SEQ ID NO: 24 і VL із SEQ ID NO: 25;

- c) VH із SEQ ID NO: 32 і VL із SEQ ID NO: 33; або
d) VH із SEQ ID NO: 34 і VL із SEQ ID NO: 35.
30. Спосіб за п. 27, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-L1.
31. Спосіб за п. 30, де антитіло до PD-L1 містить
- 5 a) VH із SEQ ID NO: 26 та VL із SEQ ID NO: 27;
b) VH із SEQ ID NO: 28 та VL із SEQ ID NO: 29; або
c) VH із SEQ ID NO: 30 та VL із SEQ ID NO: 31.
32. Спосіб за п. 27, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до PD-L2.
33. Спосіб за п. 27, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до LAG3.
- 10 34. Спосіб за п. 27, де інгібітором контрольних точок імунної відповіді є антитіло до TIM-3.
35. Спосіб за п. 34, де антитіло до TIM-3 містить:
- a) VH із SEQ ID NO: 36 та VL із SEQ ID NO: 37; або
b) VH із SEQ ID NO: 38 та VL із SEQ ID NO: 39.
36. Спосіб за будь-яким з пп. 25-35, де другий терапевтичний агент вводять одночасно.
- 15 37. Спосіб за будь-яким з пп. 25-35, де другий терапевтичний агент вводять послідовно або окремо.
38. Спосіб за будь-яким з пп. 1-37, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, вводять внутрішньовенно.
39. Спосіб за будь-яким з пп. 1-37, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, вводять підшкірно
- 20 у фармацевтичній композиції, яка містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, і гіалуронідазу.
40. Спосіб за будь-яким з пп. 1-39, де пацієнта лікують або лікували променевою терапією.
41. Спосіб за будь-яким з пп. 1-39, де пацієнт переніс або буде переносити хірургічну операцію.
42. Спосіб пригнічення активності імуносупресорної клітини, який включає приведення
- 25 імуносупресорної клітини в контакт з антитілом, що специфічно зв'язує CD38, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.
43. Спосіб за п. 42, де імуносупресорна клітина являє собою Treg.
44. Спосіб за п. 43, де Treg являє собою CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T-клітину.
- 30 45. Спосіб за п. 42, де імуносупресорна клітина являє собою MCK.
46. Спосіб за п. 45, де MCK являє собою клітину CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺.
47. Спосіб за п. 42, де імуносупресорна клітина являє собою Breg.
48. Спосіб за п. 47, де Breg є клітиною CD19⁺CD24⁺CD38⁺.
49. Спосіб за будь-яким з пп. 42-48, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, являє собою
- 35 неагоністичне антитіло.
50. Спосіб за п. 49, де неагоністичне антитіло індукує проліферацію зразка мононуклеарних клітин периферичної крові *in vitro* статистично незначним чином.
51. Спосіб за будь-яким з пп. 42-50, де антитіло, яке специфічно зв'язує CD38, містить
- 40 амінокислотну послідовність важкого ланцюга із SEQ ID NO: 12 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга із SEQ ID NO: 13.
52. Спосіб за п. 1, де пацієнт має онкологічне захворювання або вірусну інфекцію.

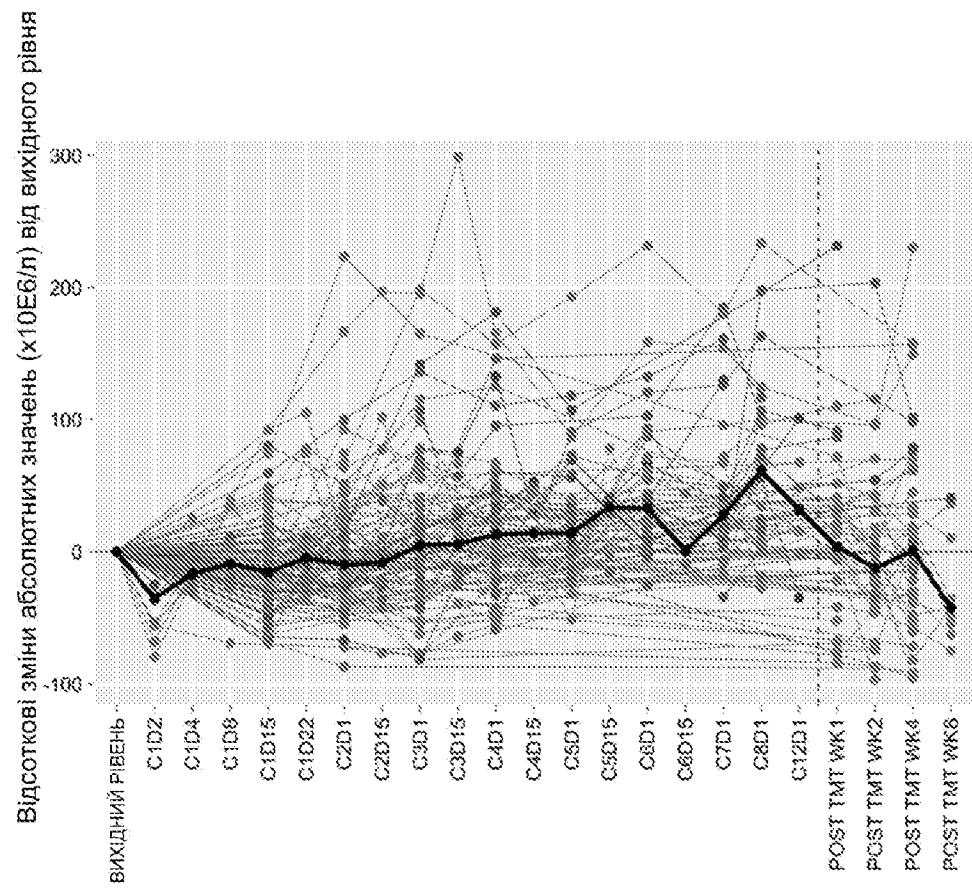
Фігура 1



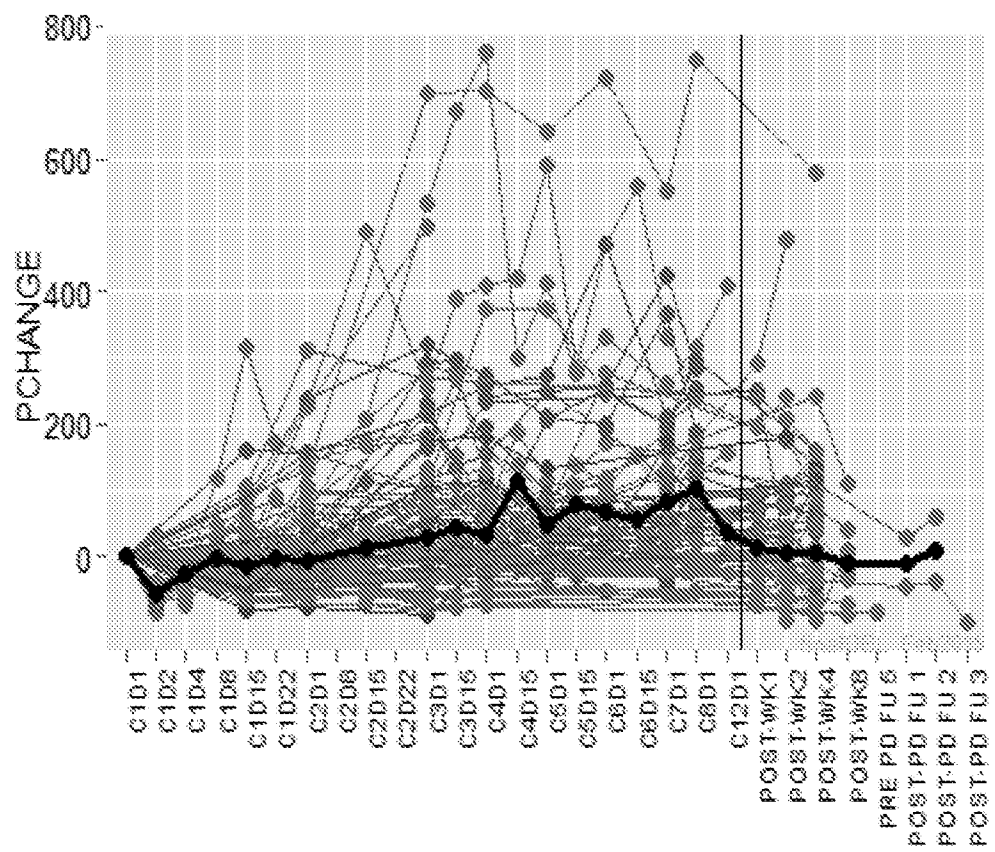
Фігура 2



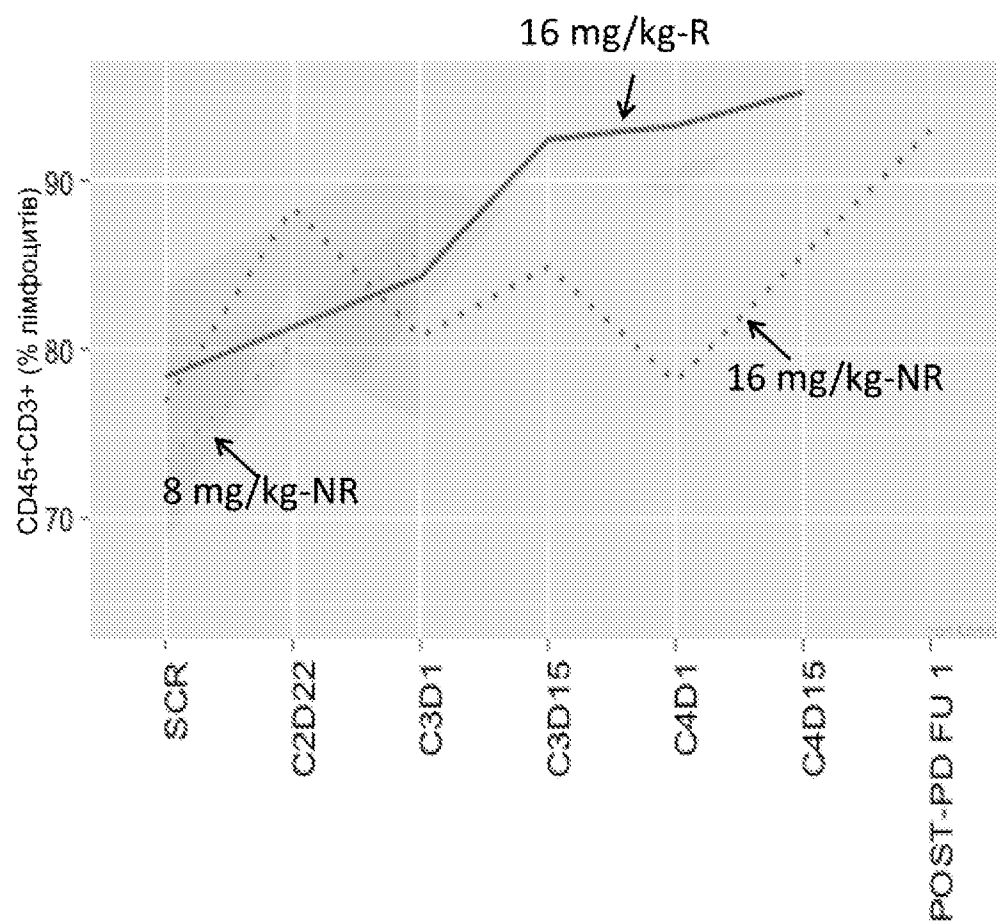
Фігура 3



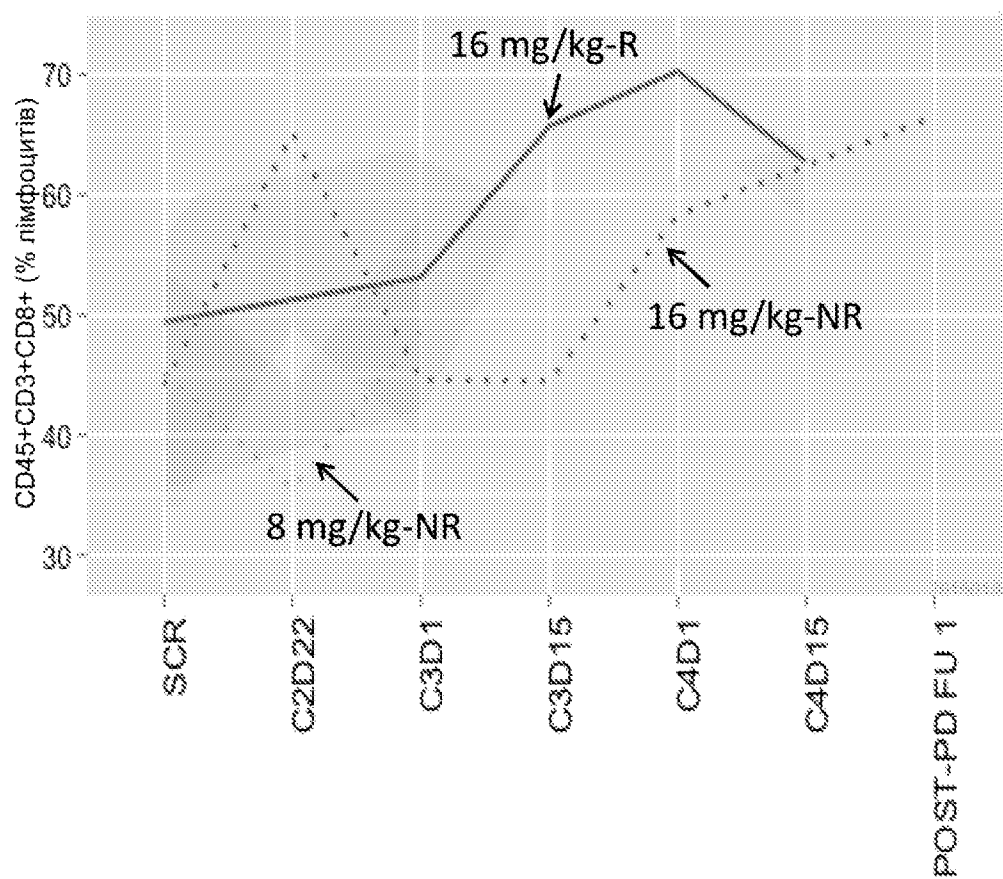
Φίγυρα 4



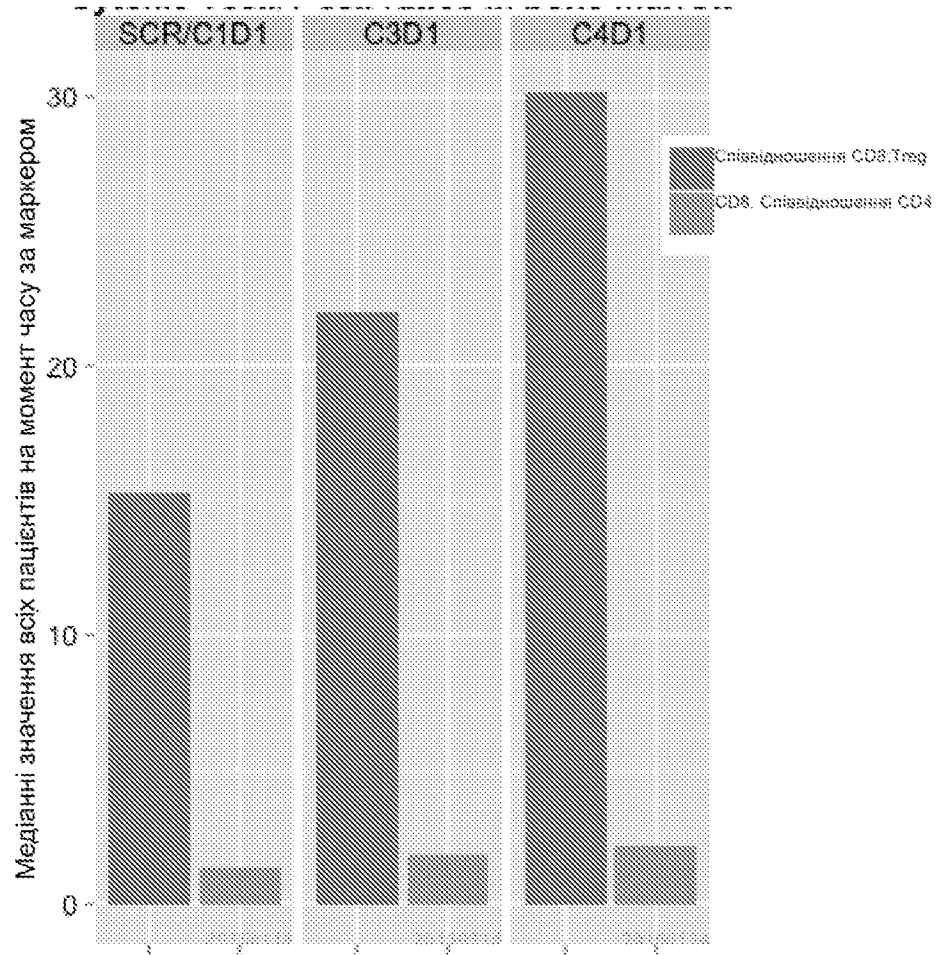
Фігура 5



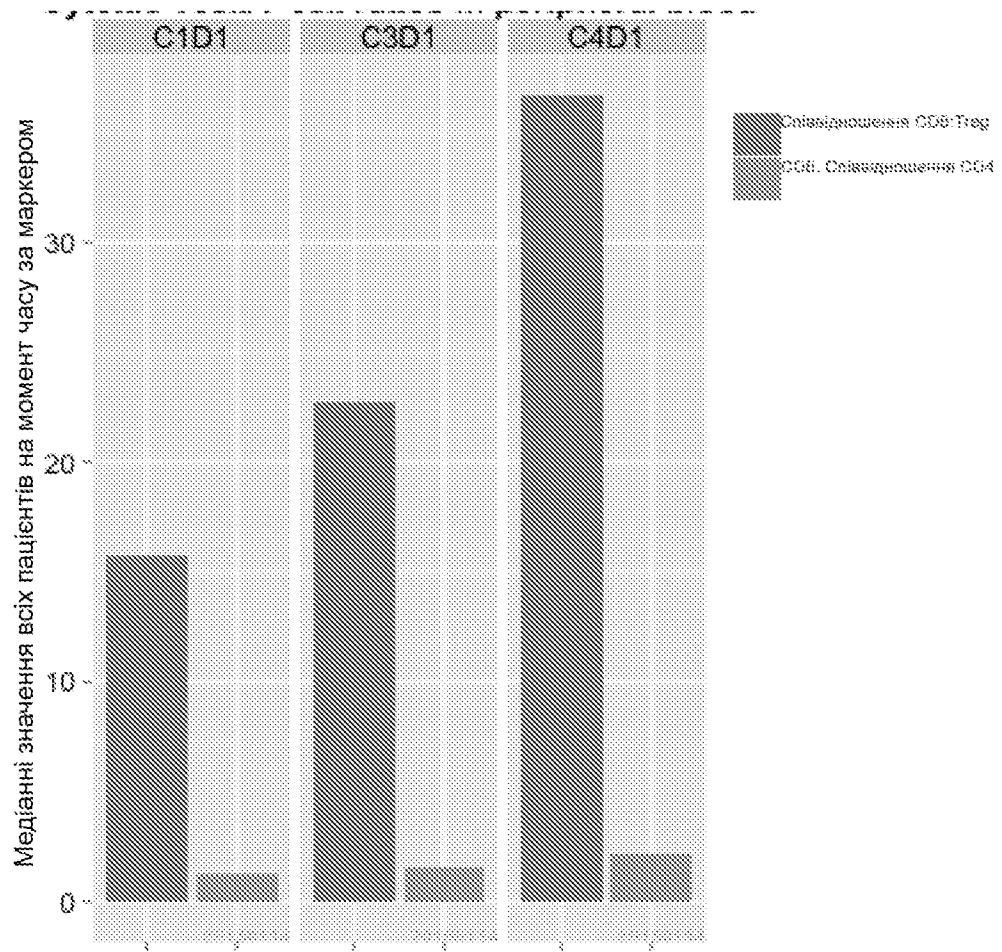
Фігура 6



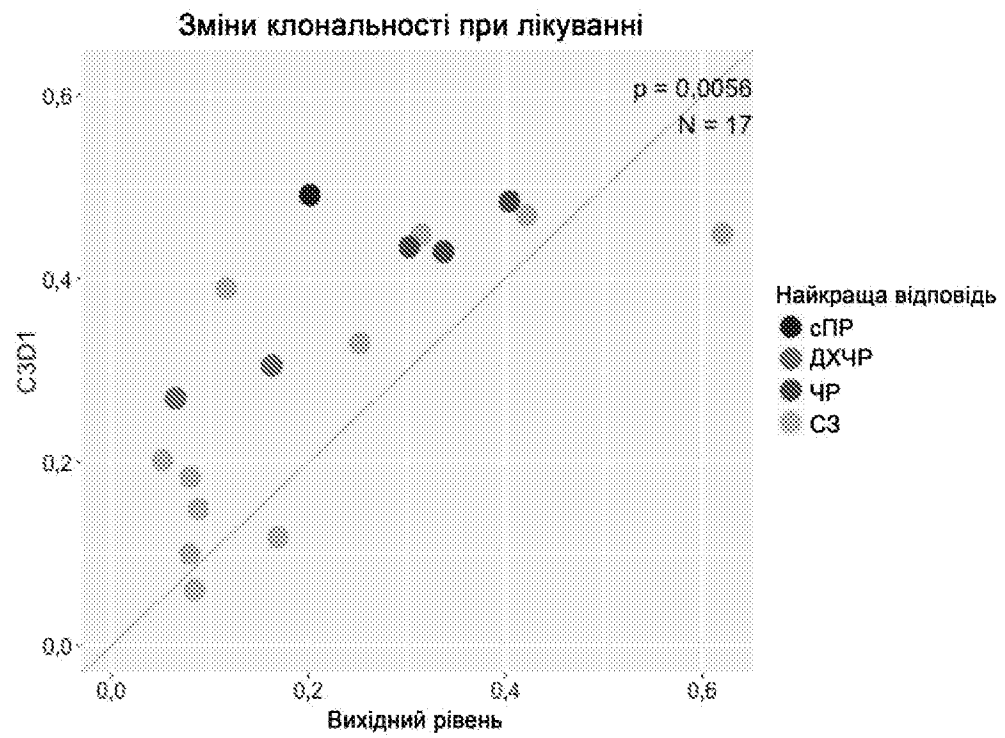
Фігура 7А



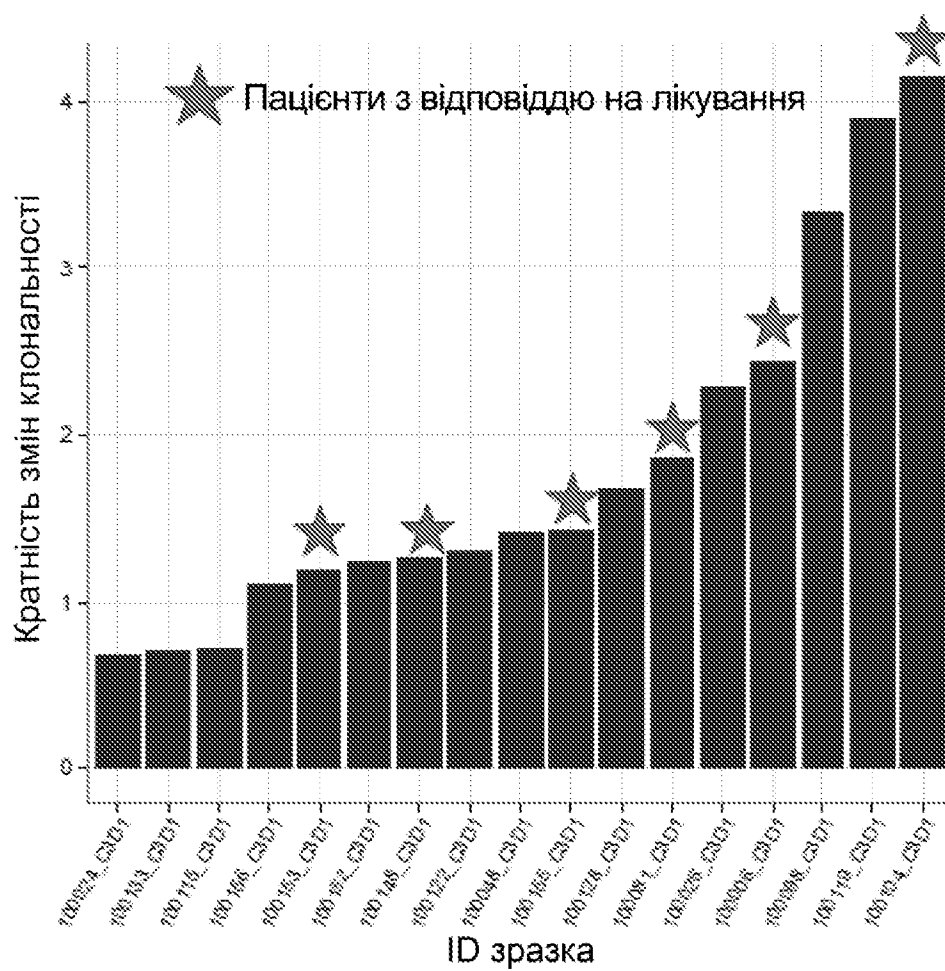
Фігура 7В



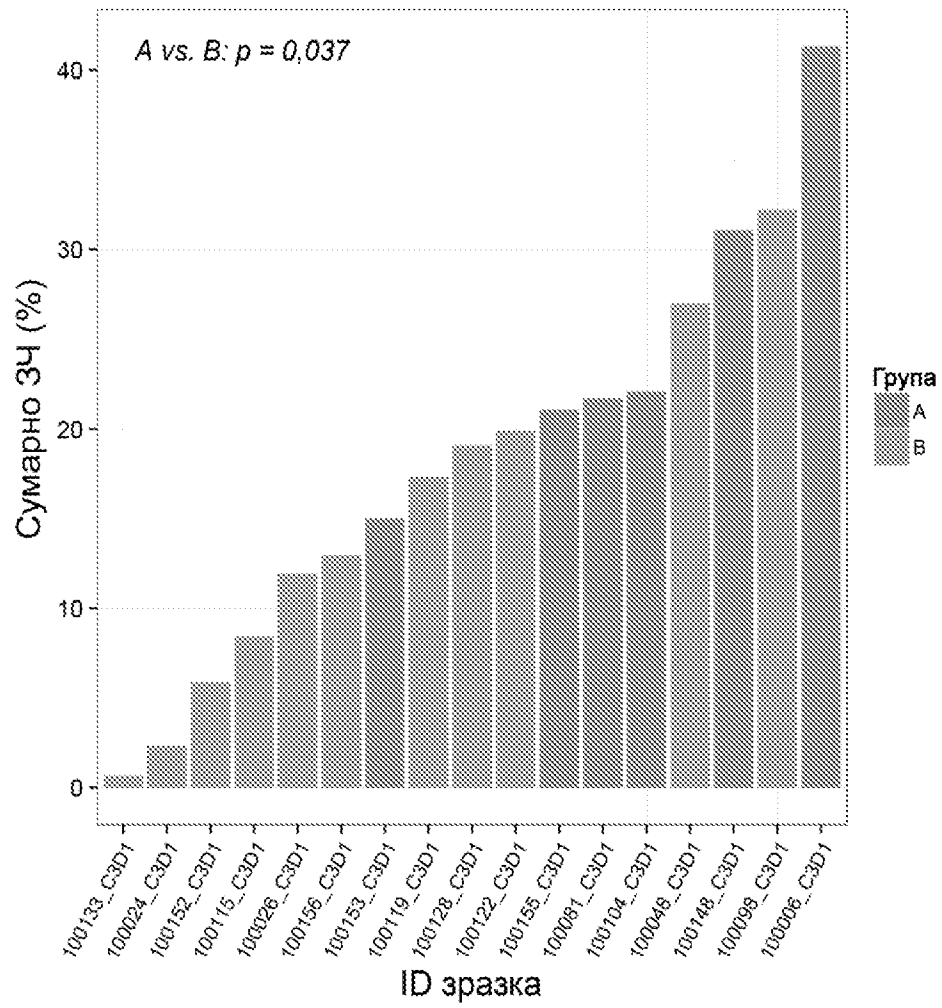
Фігура 8А



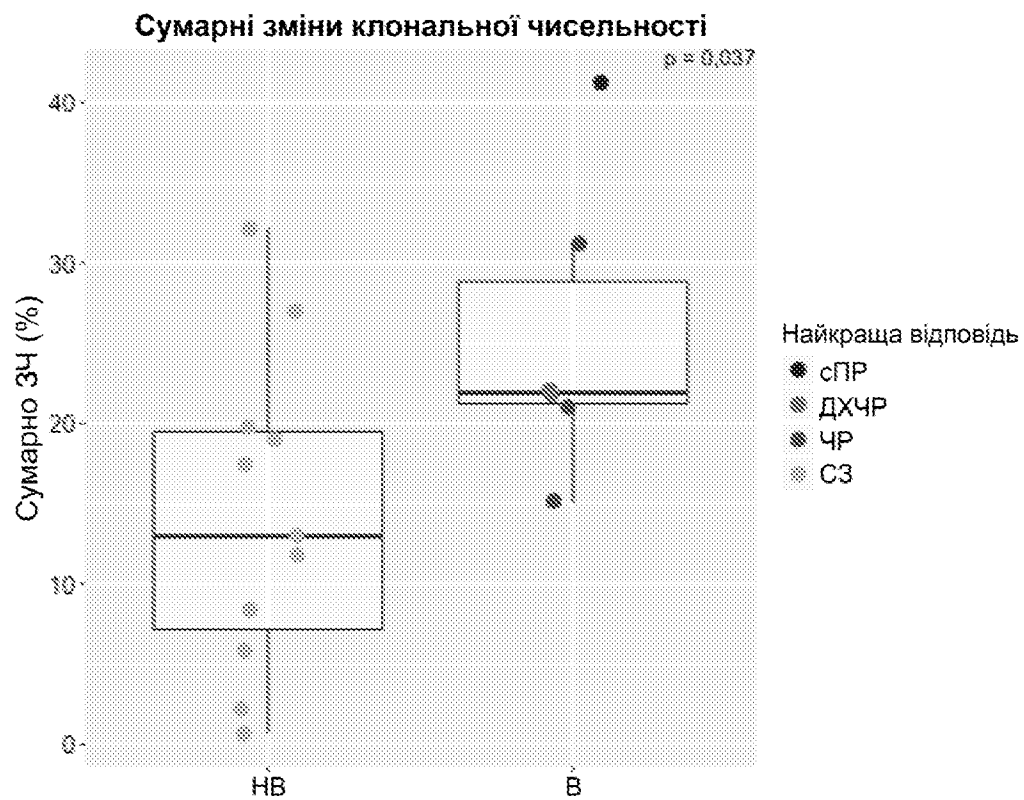
Фігура 8В



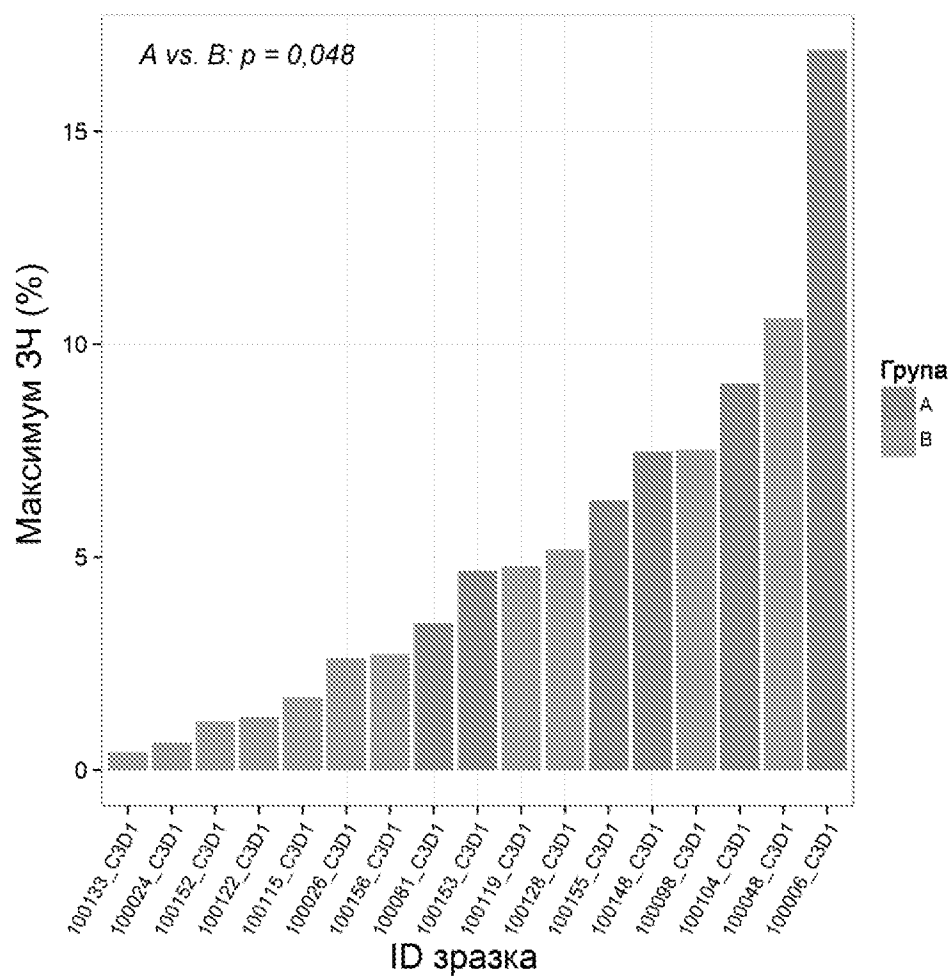
Фігура 8С



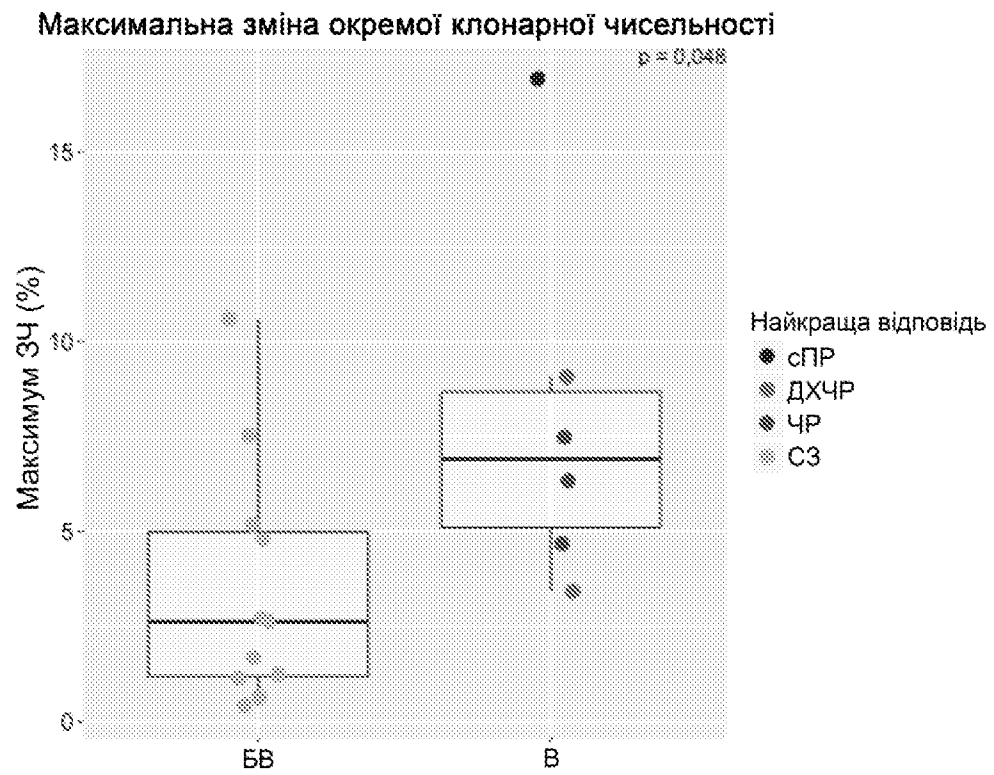
Фігура 8D



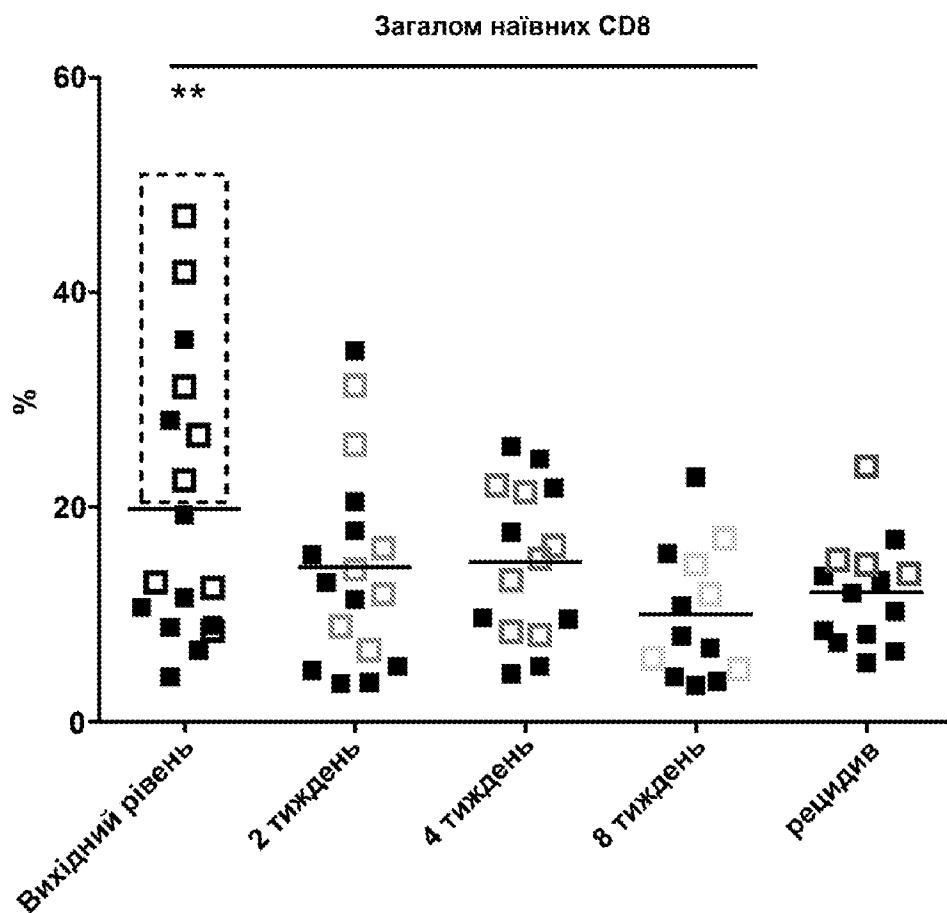
Фігура 8Е



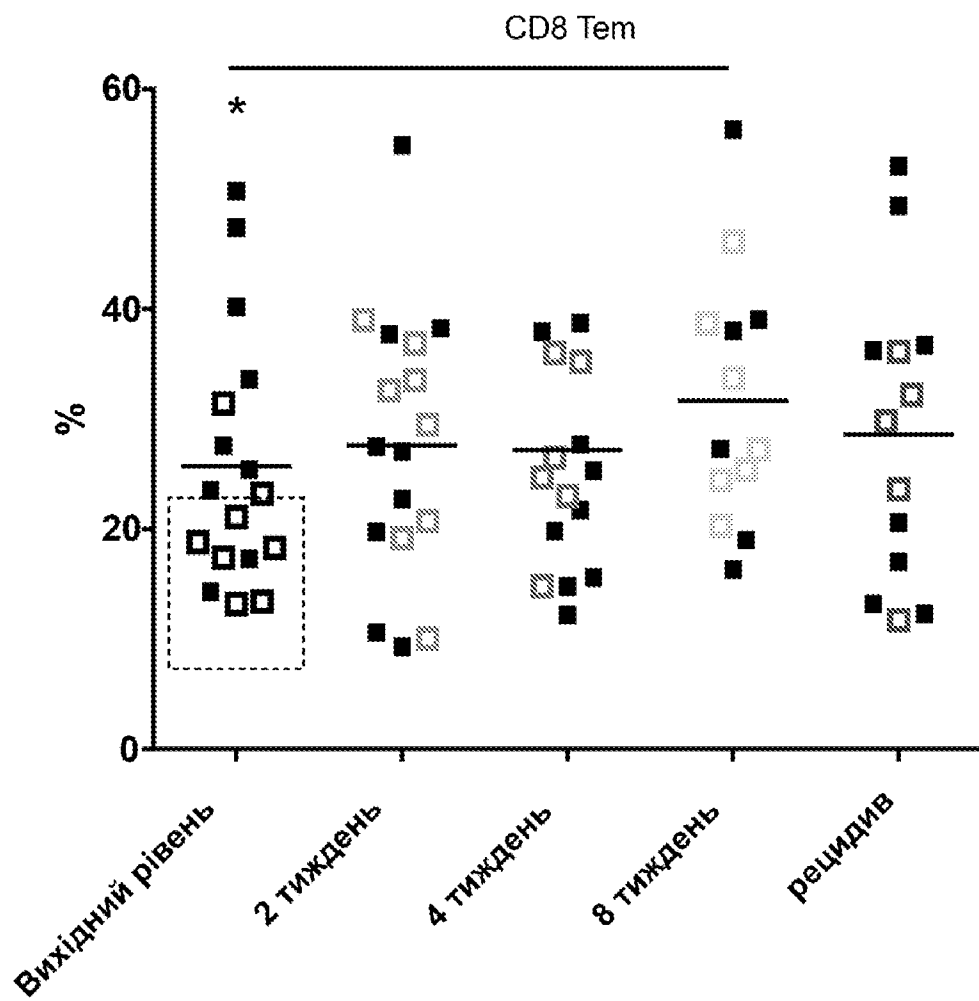
Фігура 8F



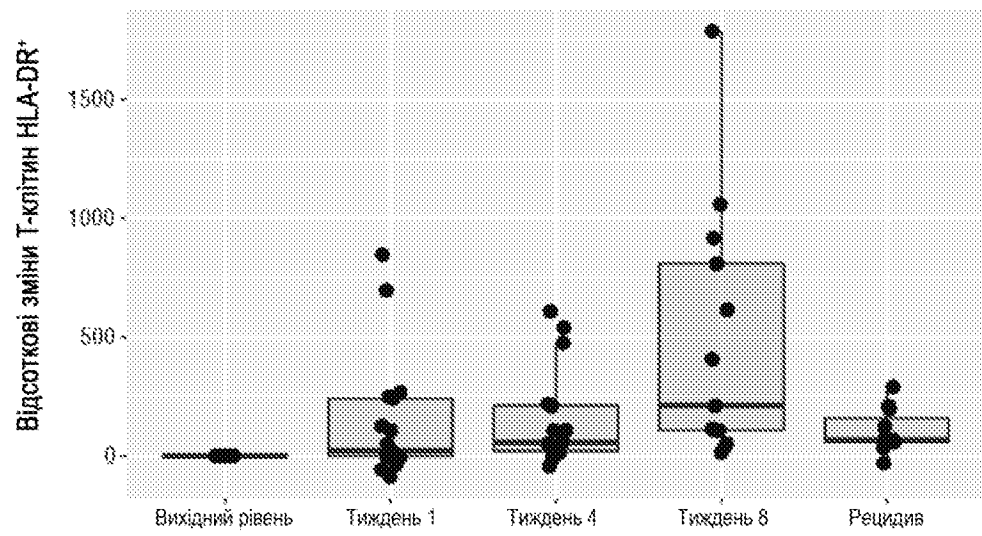
Фігура 9А



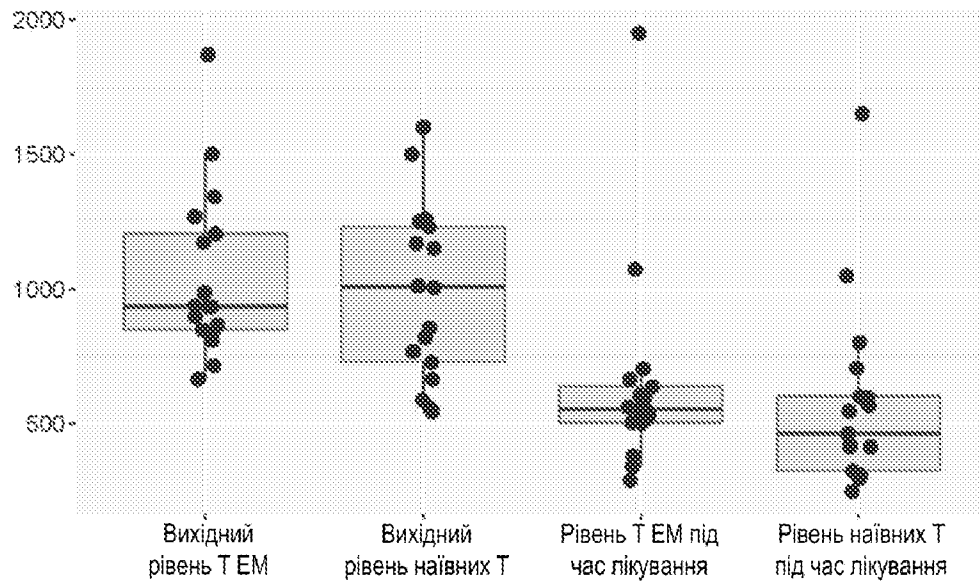
Фігура 9В



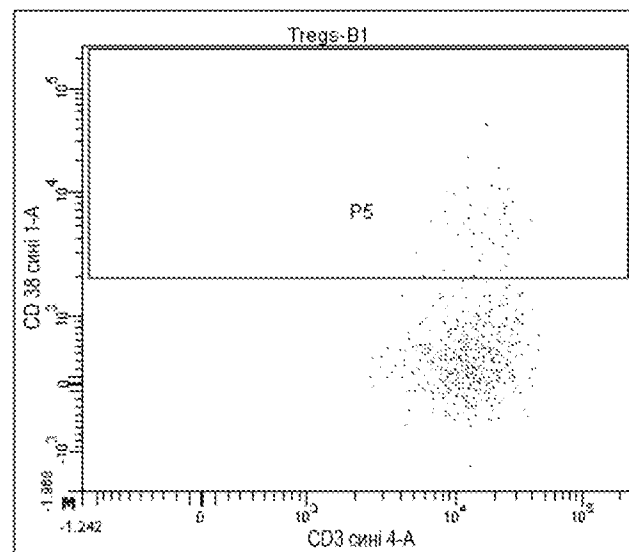
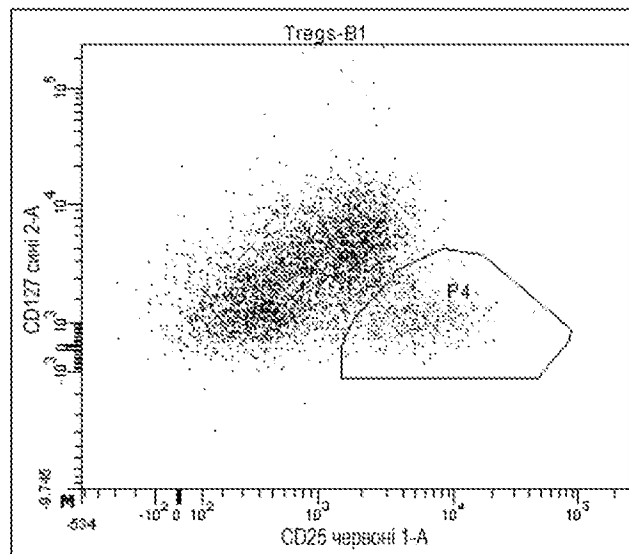
Фігура 9С



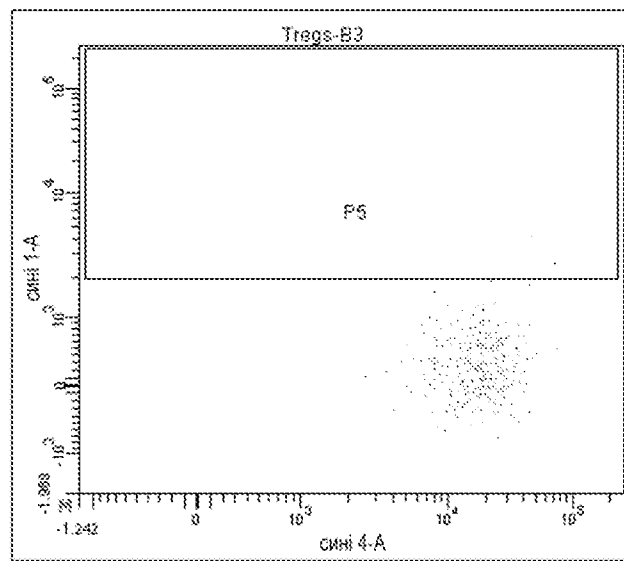
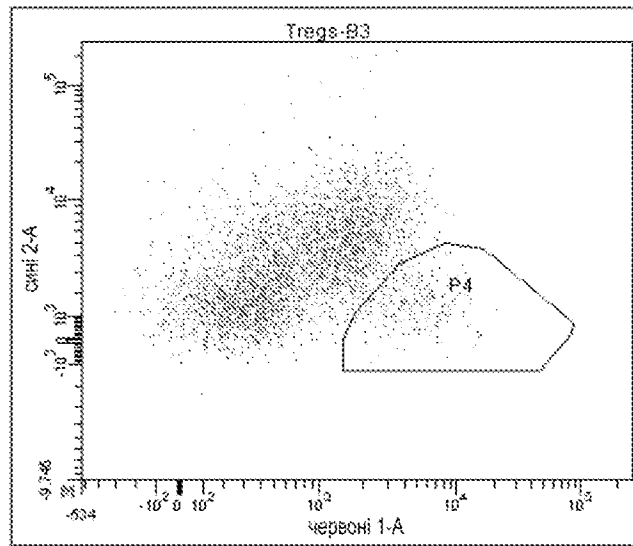
Фігура 9D



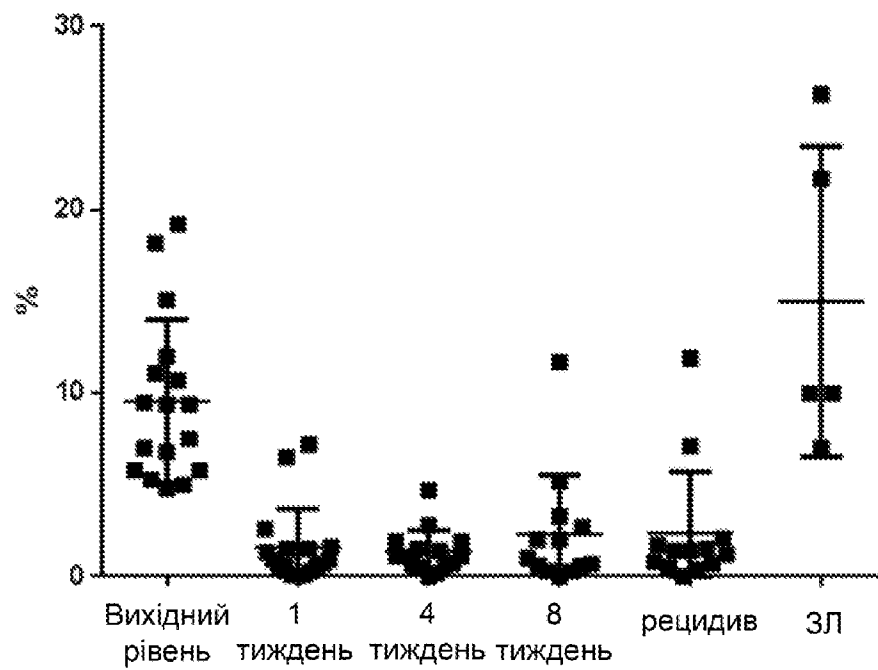
Фірыпа 10А



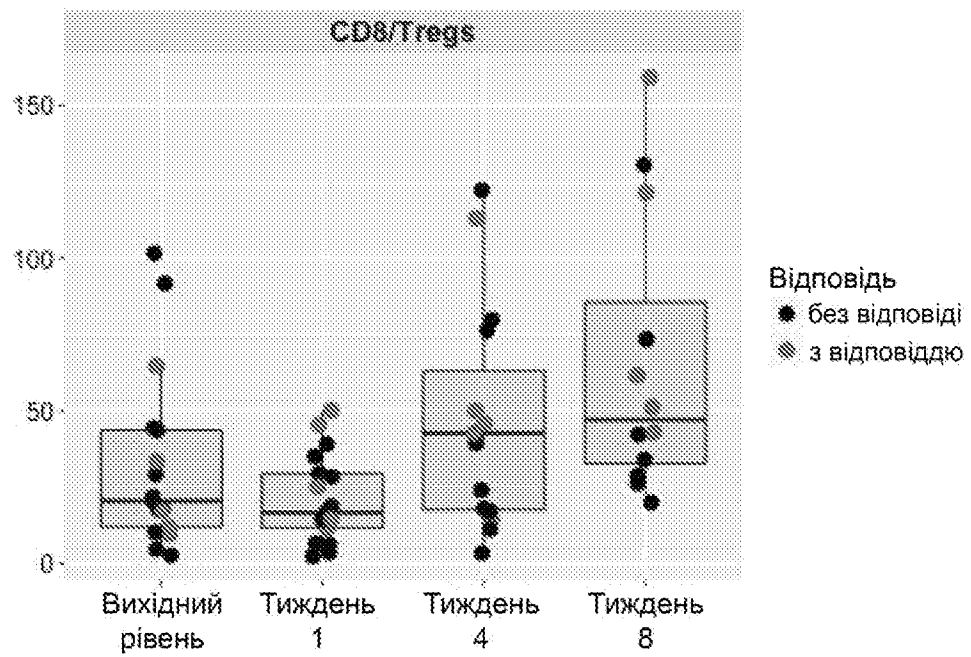
Фігура 10В



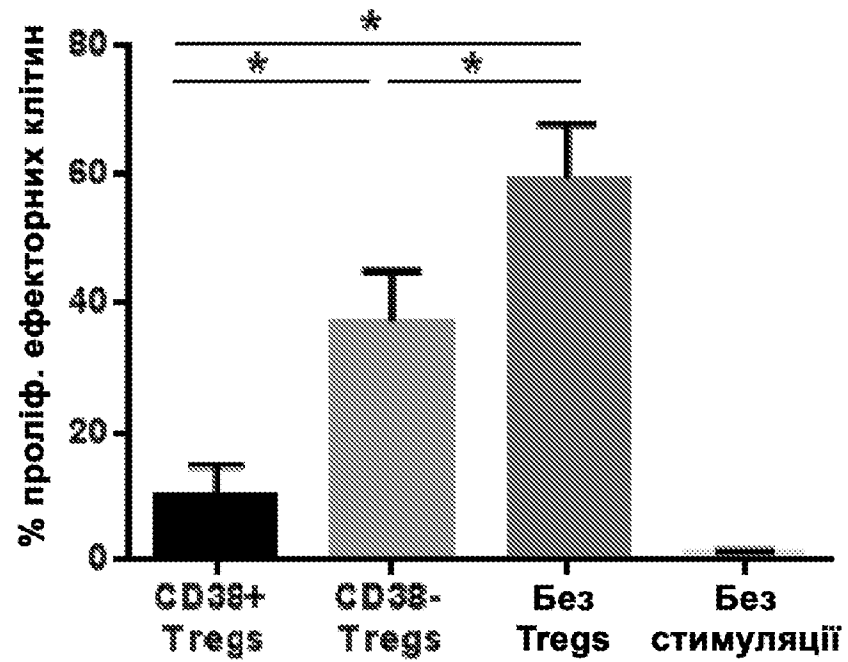
Фігура 10С



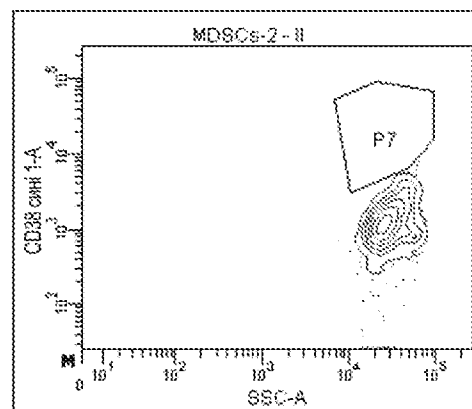
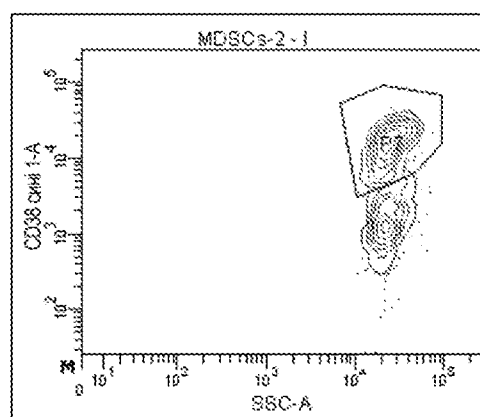
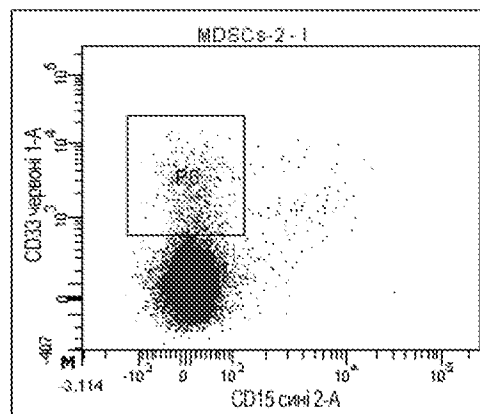
Фігура 10А



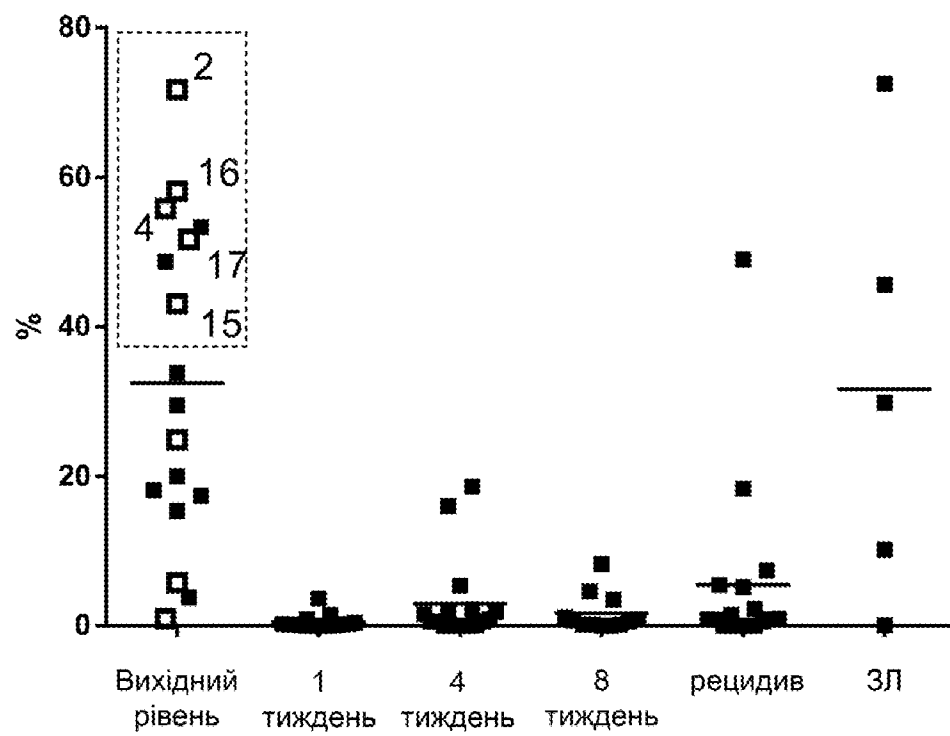
Фігура 10Е



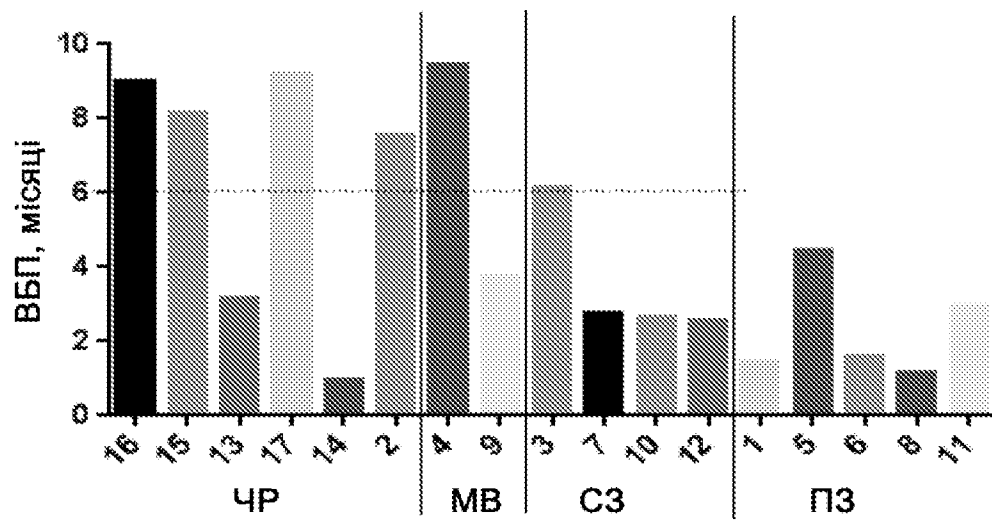
Фігура 11



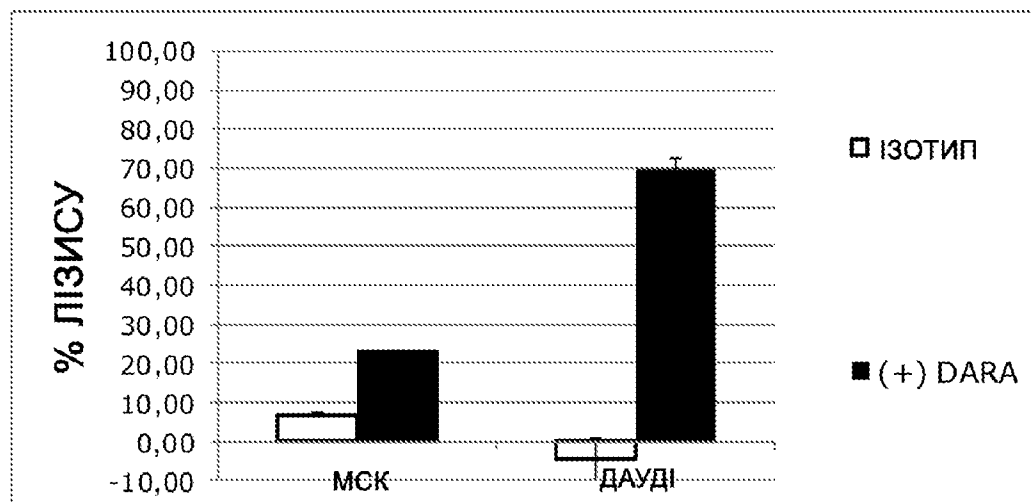
Фігура 12



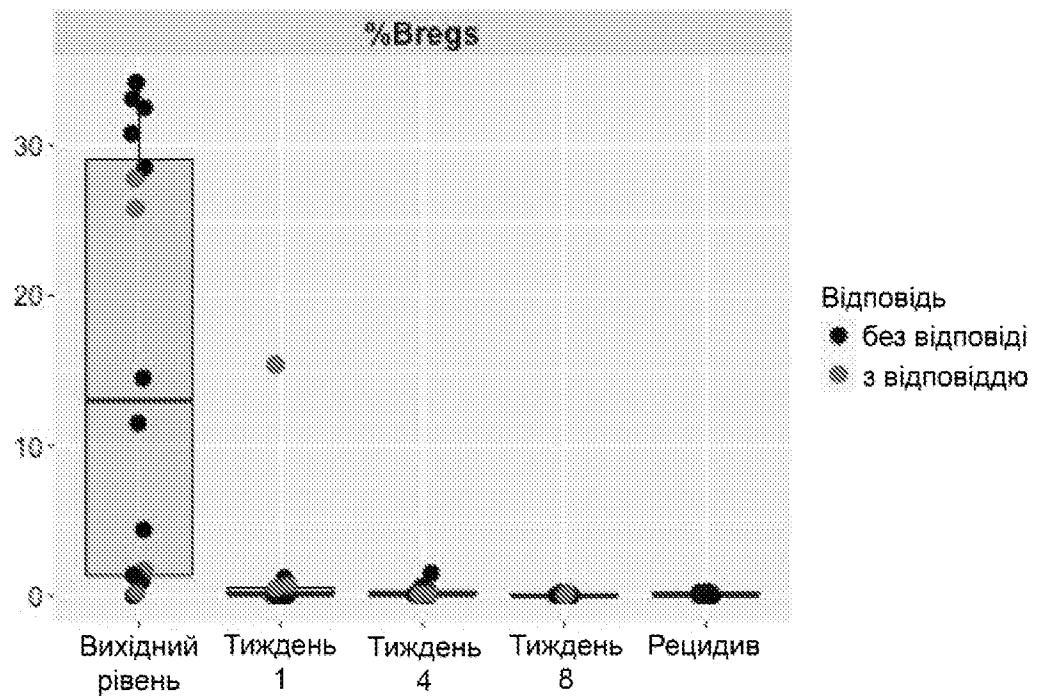
Фігура 13



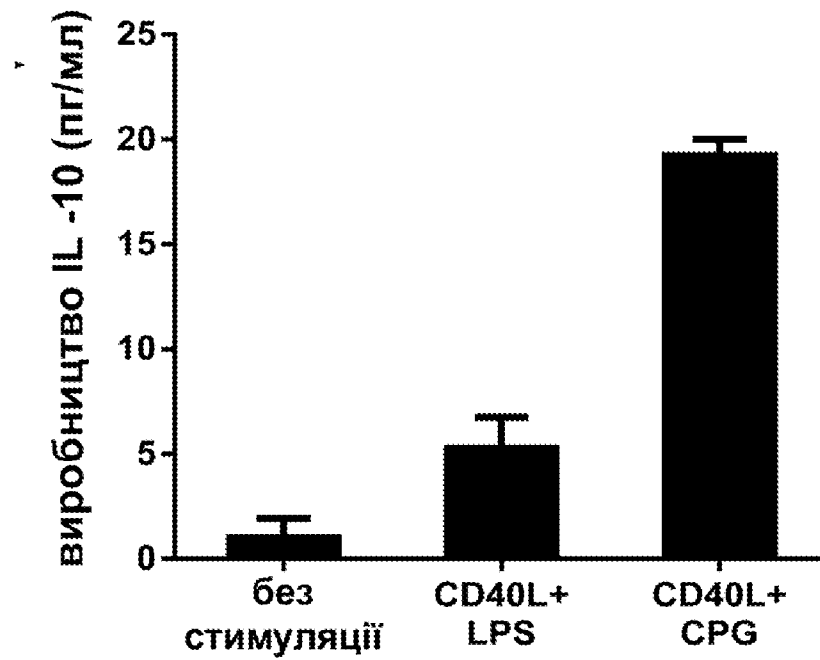
Фігура 14



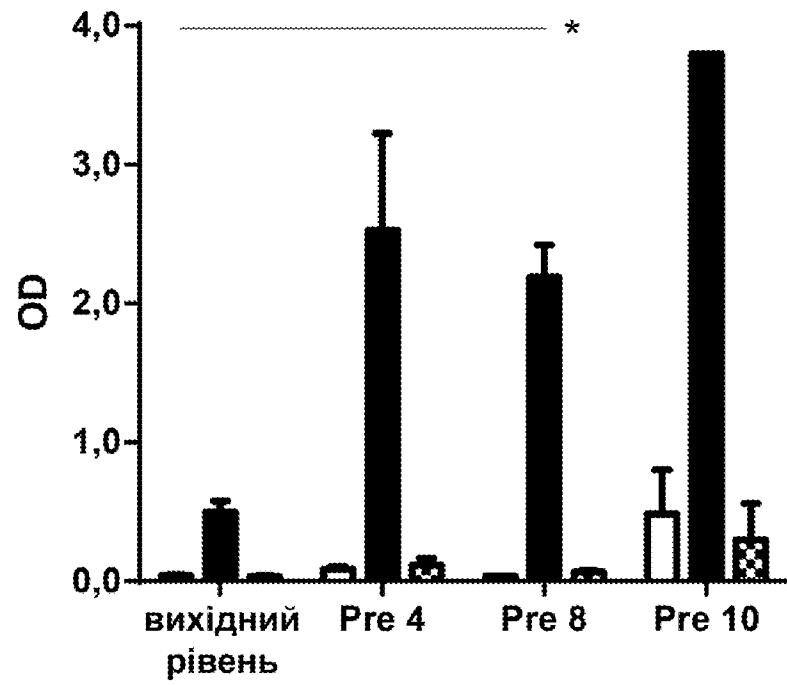
Фігура 15А



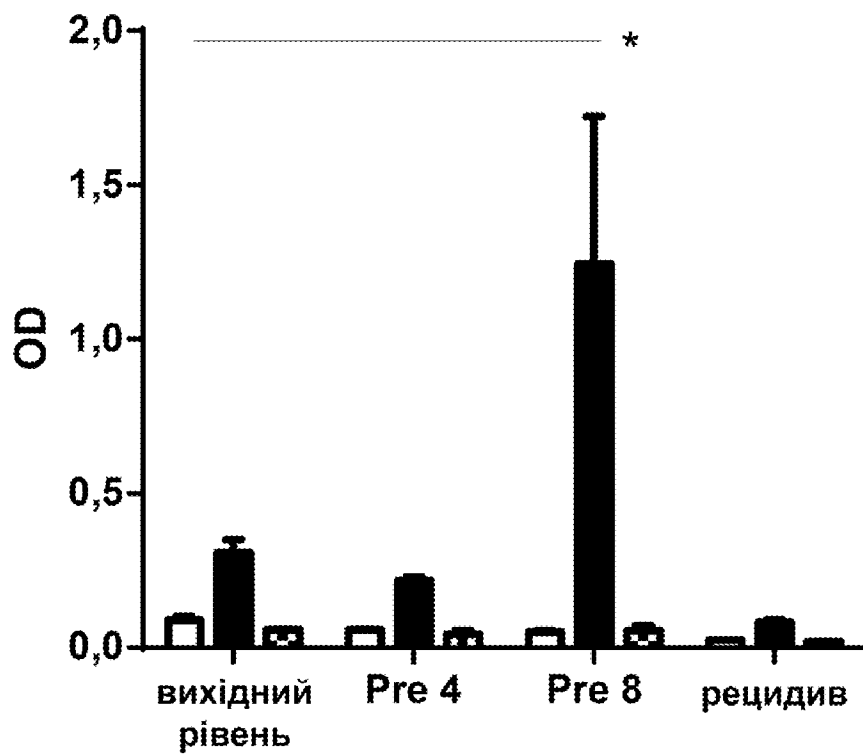
Фігура 15В



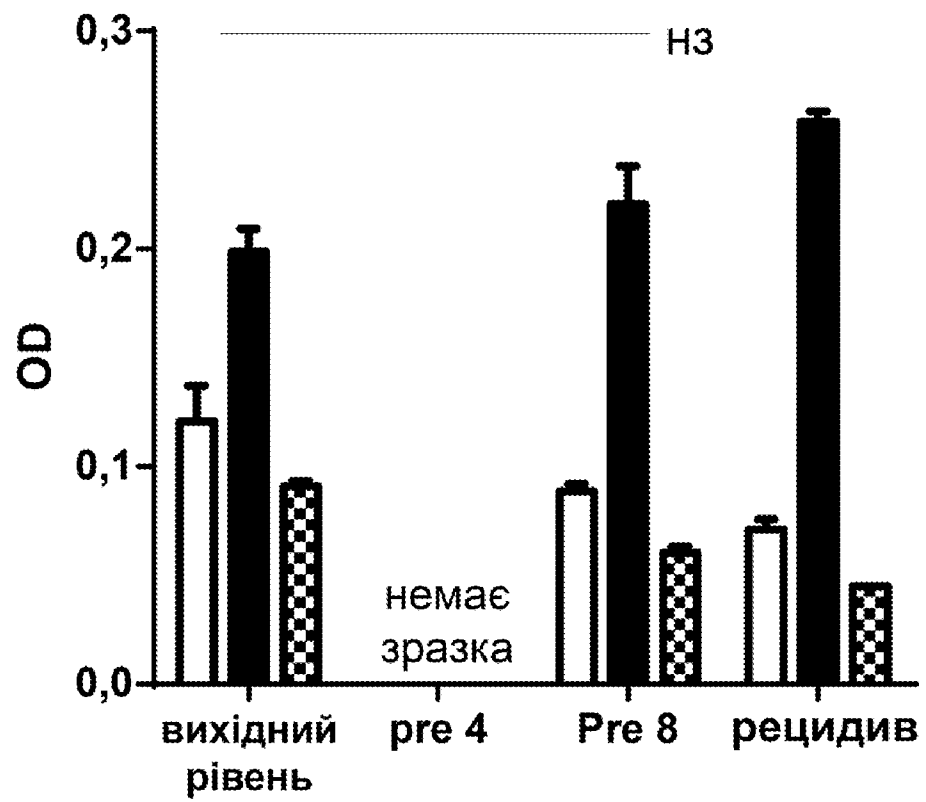
Фігура 16А



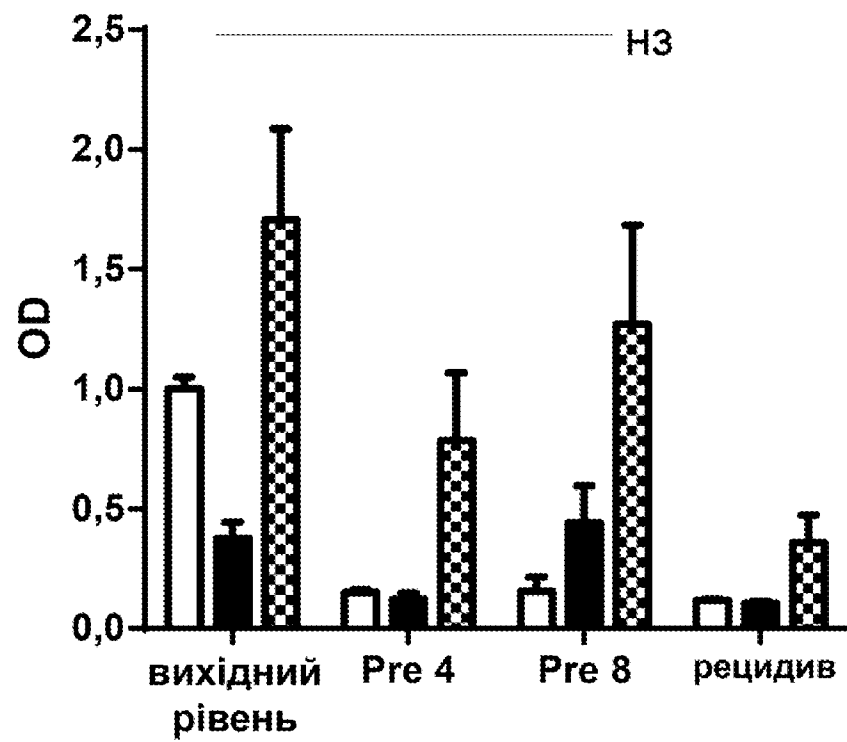
Фігура 16В



Фігура 16С

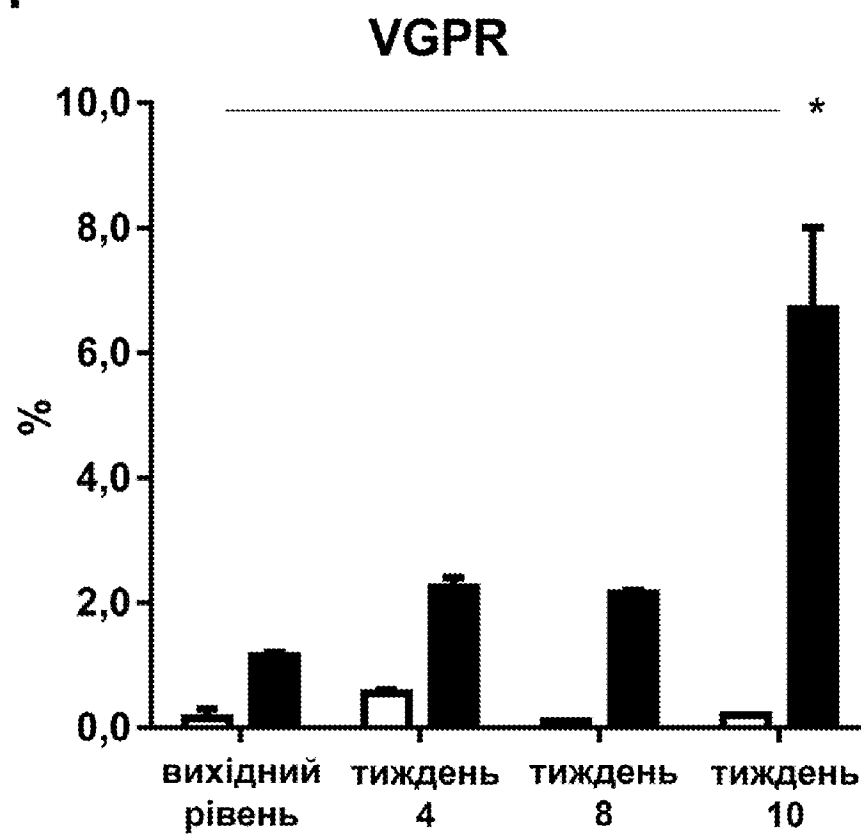


Фігура 16D

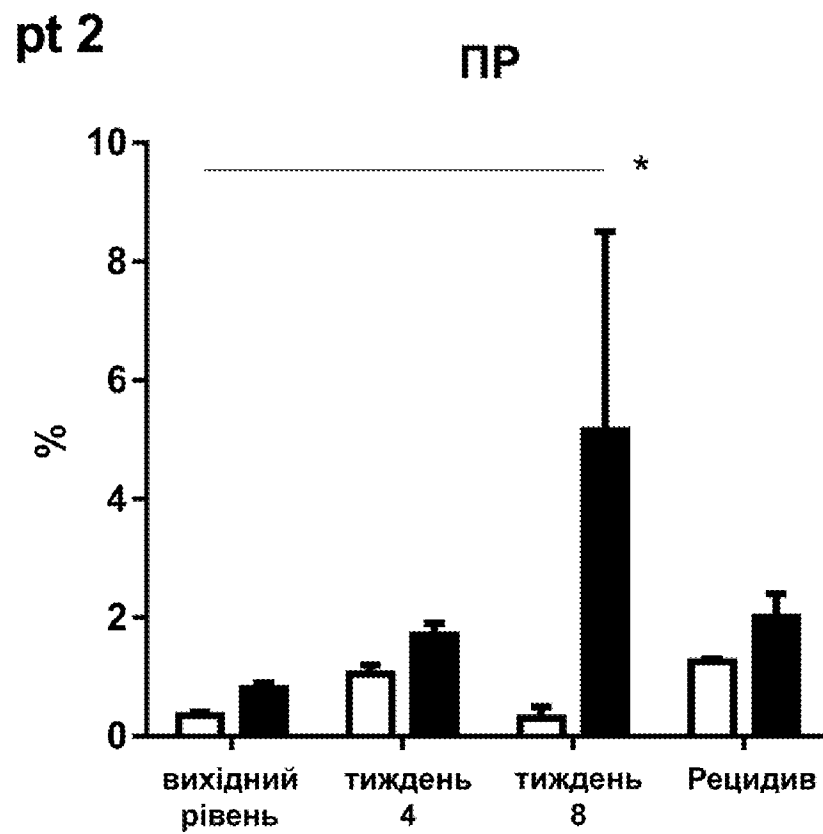


Фігура 16Е

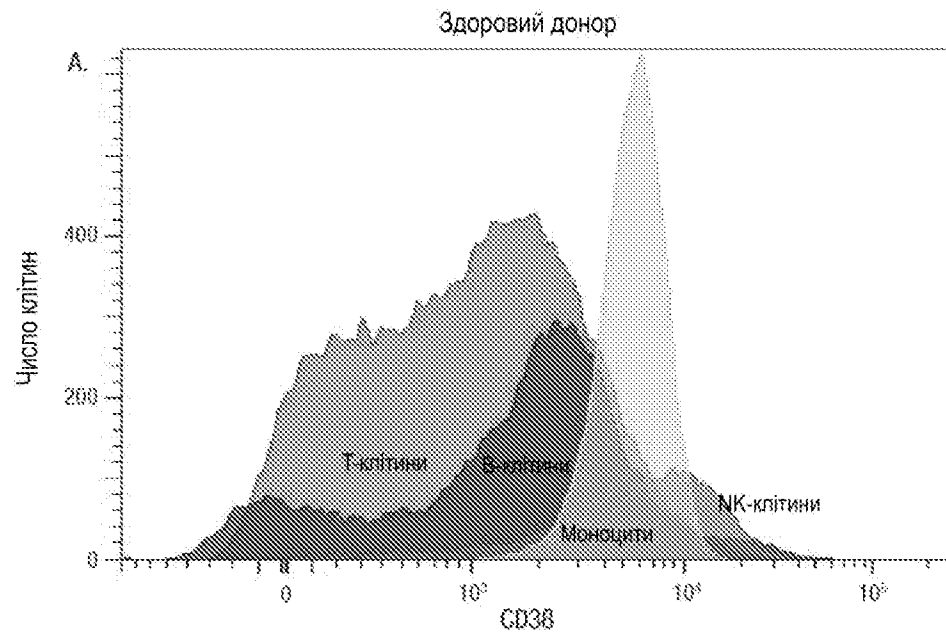
pt 1



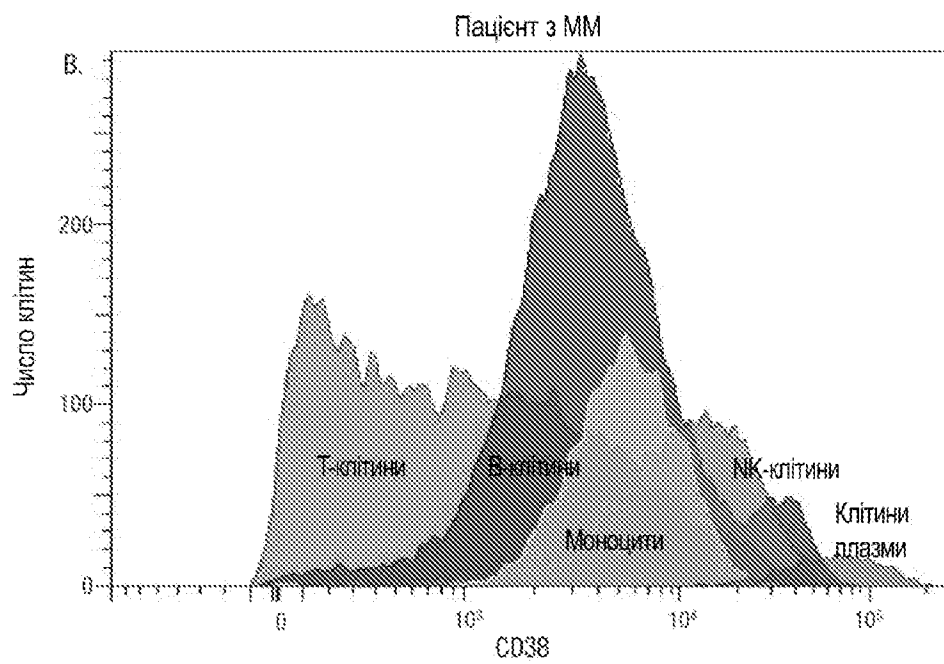
Фігура 16F



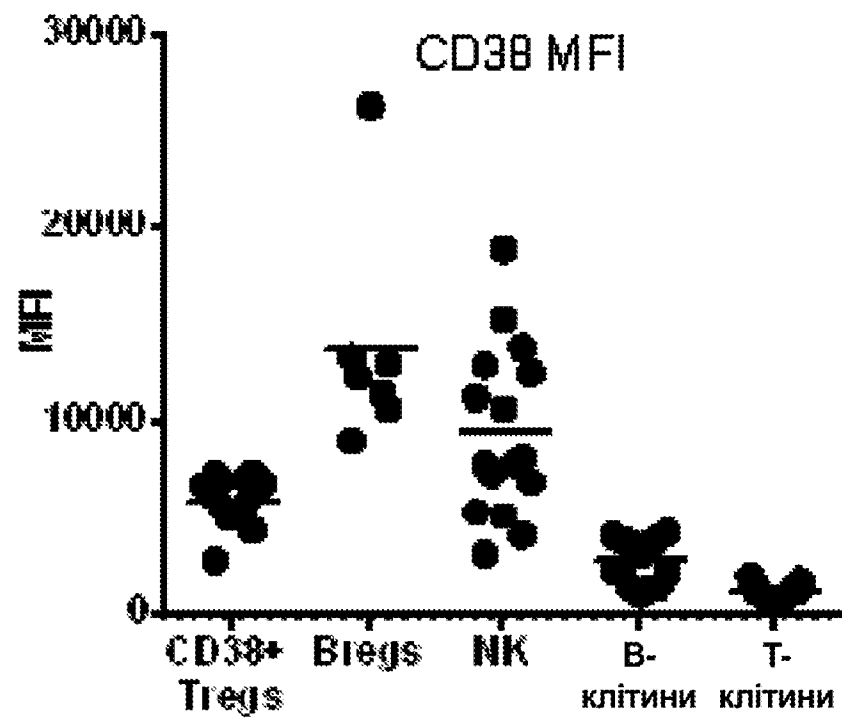
Фігура 17А



Фігура 17В



Фігура 17С



Фігура 18

