



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119486744 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 18

(21) 申请号 202380034687.8	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
(22) 申请日 2023.03.07	专利代理师 陈桢
(30) 优先权数据 63/317,253 2022.03.07 US	(51) Int.Cl. A61K 35/17 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.10.17	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2023/063869 2023.03.07	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/172917 EN 2023.09.14	
(71) 申请人 赛诺菲-安万特美国有限责任公司 地址 美国新泽西州	
(72) 发明人 M·凯隆布隆代尔 A·德庄克斯 Z·K·克利珀尔 M·梅洛尼 A·维罗内-奥多斯	权利要求书2页 说明书14页 序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称
艾萨妥昔单抗联合其他药物用于治疗多发性骨髓瘤的用途

(57) 摘要
本披露提供用于治疗多发性骨髓瘤的方法，这些方法包括向有需要的个体施用抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物，以及任选地施用CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞。

1. 抗CD38抗体用于治疗多发性骨髓瘤的用途,其中该抗CD38抗体与白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)联合施用给个体,其中该抗CD38抗体在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期,且向该个体施用该IL-2类似物,其中该IL-2类似物每两周施用一次或每三周施用一次。

2. 如权利要求1所述的用途,其中该抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗,且以10mg/kg的剂量静脉内施用。

3. 如权利要求1所述的用途,其中该CD-38抗体是艾萨妥昔单抗,且以1400mg的剂量皮下施用。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该IL-2类似物包含非天然氨基酸N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK),且其中该AzK是聚乙二醇化的。

5. 如权利要求1所述的用途,其中该IL-2类似物以16ug/kg、24ug/kg或32ug/kg的剂量施用。

6. 如权利要求1-3或5中任一项所述的用途,其中该抗CD38抗体在28天周期的第1天和第15天施用持续至少11个周期,且然后在28天周期的第1天施用持续一个或多个另外的周期。

7. 如权利要求1-3或5中任一项所述的用途,其中该个体在接受该第一个治疗周期之前接受了一线或多线用于治疗多发性骨髓瘤的疗法,其中该一线或多线先前的疗法包含抗CD38药剂和抗BCMA药剂。

8. 抗CD38抗体用于治疗多发性骨髓瘤的用途,其中该抗CD38抗体与白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)联合施用给个体,

其中该抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗,且其中该IL-2类似物包含非天然氨基酸N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK),其中该AzK是聚乙二醇化的,

其中该艾萨妥昔单抗在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用,且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期,

其中该艾萨妥昔单抗以10mg/kg的剂量静脉内施用或者以1400mg的剂量皮下施用,

其中该IL-2类似物以16ug/kg、24ug/kg或32ug/kg的剂量每两周一次或每三周一次施用给该个体,且

其中该个体在接受该第一个治疗周期之前接受了一线或多线用于治疗多发性骨髓瘤的疗法,其中该一线或多线先前的疗法包含抗CD38药剂和抗BCMA药剂。

9. 如权利要求1-3、5或8中任一项所述的用途,其中还向该个体施用CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞(NK-CD38KO细胞)。

10. 如权利要求9所述的用途,其中这些NK细胞是从人类样本中分离出来的。

11. 一种治疗患有多发性骨髓瘤的人类个体的方法,该方法包括:

向该个体施用抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物(IL-2类似物),其中该抗CD38抗体在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用,且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期,以及

向该个体施用该IL-2类似物,其中该IL-2类似物每两周施用一次或每三周施用一次。

12. 如权利要求11所述的方法,其中该抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗,且以10mg/kg的剂量静脉内施用。

13. 如权利要求11所述的方法,其中该CD-38抗体是艾萨妥昔单抗,且以1400mg的剂量皮下施用。

14. 如权利要求11-13中任一项所述的方法,其中该IL-2类似物包含非天然氨基酸N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK),且其中该AzK是聚乙二醇化的。

15. 如权利要求14所述的方法,其中该IL-2类似物以16ug/kg、24ug/kg或32ug/kg的剂量施用。

16. 如权利要求11-13或15中任一项所述的方法,其中,该抗CD38抗体在28天周期的第1天和第15天施用持续至少11个周期,然后在28天周期的第1天施用该抗CD38抗体持续一个或多个另外的周期。

17. 一种治疗患有多发性骨髓瘤的人类个体的方法,该方法包括:

向该个体施用抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物(IL-2类似物),

其中该抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗,且其中该IL-2类似物包含非天然氨基酸N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK),其中该AzK是聚乙二醇化的,

其中该艾萨妥昔单抗在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用,且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期,且

其中该艾萨妥昔单抗以10mg/kg的剂量静脉内施用或者以1400mg的剂量皮下施用,

其中该IL-2类似物以16ug/kg、24ug/kg或32ug/kg的剂量每两周一次或每三周一次施用给该个体,且

其中该个体在接受该第一个治疗周期之前接受了一线或多线用于治疗多发性骨髓瘤的疗法,其中该一线或多线先前的疗法包含抗CD38药剂和抗BCMA药剂。

18. 如权利要求11-13、15或17中任一项所述的方法,其中还向该个体施用CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞(NK-CD38KO细胞)。

19. 如权利要求18所述的方法,其中这些NK细胞是从人类样本中分离出来的。

艾萨妥昔单抗联合其他药物用于治疗多发性骨髓瘤的用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年3月7日提交的美国临时申请号63/317,253的优先权权益,该美国临时申请的内容通过引用以其全文并入本文。

参考电子序列表

[0002] 电子序列表的内容(183952034340SEQLIST.xml;大小:11,571字节;以及创建日期:2023年3月6日)通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本披露涉及通过施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)来治疗多发性骨髓瘤的方法。

背景技术

[0004] 多发性骨髓瘤(MM)是一种恶性浆细胞疾病,其特征在于骨髓(BM)中浆细胞的克隆增殖和过量单克隆免疫球蛋白(通常为IgG或IgA型或游离尿轻链,即副蛋白、M蛋白或M组分)的产生。患有MM的患者可经历骨痛、骨折、疲劳、贫血、感染、高钙血症和肾脏问题(Rollig等人(2015)Lancet.[柳叶刀]385(9983):2197-208)。CD38的表达在MM中尤其显著,因为>98%的患者对这种蛋白质呈阳性(Goldmacher等人(1994)Blood.[血液]84(9):3017-25;Lin等人(2004)Am J Clin Pathol.[美国临床病理学杂志]121(4):482-8)。CD38在恶性克隆MM细胞上强而均匀的表达与在正常细胞上的限制性表达模式形成鲜明对比,这表明此抗原可用于肿瘤细胞的特异性靶向。

[0005] 一般来说,MM患者在其生命周期内将接受治疗方案,这些治疗方案包含单独或联合使用的药物,例如蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米、伊沙佐米和卡非佐米)和免疫调节剂或“IMiDs®”(例如,来那度胺、泊马度胺和沙利度胺)、单克隆抗体(例如,埃罗妥珠单抗)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(例如,帕比司他)。

[0006] 尽管在总生存(OS)方面取得了重大进展和延长,但多发性骨髓瘤(MM)仍然无法治愈,大多数患者会复发并需要另外的治疗(Kumar SK,Rajkumar V,Kyle RA等人,Multiple myeloma.[多发性骨髓瘤]Nat Rev Dis Primer.[自然评论疾病引物]2017;3:17046)。

[0007] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请、专利出版物和UniProtKB/Swiss-Prot登录号)均通过引用以其全文并入本文,如同每个单独的参考文献被具体且单独地指示为通过引用并入一样。

发明内容

[0008] 本文提供用于治疗多发性骨髓瘤的抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)。在一些实施例中,本文提供的抗CD38抗体和IL-2类似物与CD38的表达减少或被敲除的NK细胞(NK-CD38KO细胞)联合。

[0009] 本文提供治疗多发性骨髓瘤的方法,这些方法包括:向个体施用抗CD38抗体和白

细胞介素-2类似物(IL-2类似物),其中该抗CD38抗体在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用,且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期;以及向该个体施用该IL-2类似物,其中该IL-2类似物每两周施用一次或每三周施用一次。在一些实施例中,该方法包括联合抗CD38抗体和/或IL-2类似物施用NK-CD38K0细胞。

[0010] 本文提供抗CD38抗体用于治疗多发性骨髓瘤的用途,其中该抗CD38抗体与白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)联合施用给个体,其中该抗CD38抗体在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天施用且然后在28天周期的第1天和第15天施用持续至少一个另外的周期,且其中该IL-2类似物每两周施用一次或每三周施用一次。在一些实施例中,该抗CD38抗体和IL-2类似物与NK-CD38K0细胞联合施用。

附图说明

[0011] 图1为柱状图,其显示在存在艾萨妥昔单抗(浅灰色)或同种型对照(深灰色)的情况下,与野生型KNK细胞相比,来自BC50样本中的CD38 K0 K-NK细胞避免了自相残杀效应。

[0012] 图2为柱状图,其显示在存在艾萨妥昔单抗(浅灰色)或同种型对照(深灰色)的情况下,与野生型KNK细胞相比,来自BC45样本中的CD38 K0 K-NK细胞避免了自相残杀效应。

具体实施方式

概述

[0013] 本披露提供用于治疗多发性骨髓瘤的抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)。在一些实施例中,本文提供的抗CD38抗体和IL-2类似物与CD38的表达减少或被敲除的NK细胞(NK-CD38K0细胞)联合。本文提供用于治疗个体中多发性骨髓瘤(MM)或延缓个体中MM的进展的方法。在一些实施例中,患者之前并未接受过针对MM的治疗(例如,新诊断的MM)。在一些实施例中,个体已经接受了一种、两种、三种或超过三种针对MM的先前疗法。在一些实施例中,个体已经接受了一线或多线先前的包含抗CD38药剂和抗BCMA药剂的疗法。

[0014] 本文提供治疗多发性骨髓瘤的方法,这些方法包括向个体施用抗CD38抗体和白细胞介素-2类似物(IL-2类似物)。本文提供抗CD38抗体用于治疗多发性骨髓瘤的用途,其中抗CD38抗体与IL-2类似物联合施用给个体。在本文提供的方法和用途的一些实施例中,抗CD38抗体和IL-2类似物与NK-CD38K0细胞联合施用。

[0015] 这些方法包括联合CD38表达已被“敲除”的自然杀伤(NK)细胞(例如,细胞已进行基因修饰以去除全部或部分CD38基因使得该细胞不表达CD38)或IL-15或其类似物或其组合向个体施用有效量的抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)。在一些实施例中,还施用地塞米松。在一些实施例中,治疗延长了个体的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)。在一些实施例中,与未接受治疗的个体相比,治疗延长了个体的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)。在一些实施例中,个体在治疗后对最小残留疾病(MRD)呈阴性(例如,阈值为 10^{-4} 或更低、 10^{-5} 或更低、或 10^{-6} 或更低)(也称为“MRD阴性”)。

抗CD38抗体

[0016] 在一些实施例中,抗CD38抗体结合到人CD38。在一些实施例中,抗CD38抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施例中,抗CD38抗体包括:(a)重链可变结构域(V_H),该重链可变结构域包括:包含氨基酸序列DYWMQ(SEQ ID NO:1)的CDR-H1、包含氨基酸序列

TIYPGDGDTGYAQKFQG (SEQ ID NO:2) 的CDR-H2、以及包含氨基酸序列GDYYGSNSLDY (SEQ ID NO:3) 的CDR-H3;以及(b)轻链可变结构域(V_L),该轻链可变结构域包括:包含氨基酸序列KASQDVSTVVA (SEQ ID NO:4) 的CDR-L1、包含氨基酸序列SASYRYI (SEQ ID NO:5) 的CDR-L2、以及包含氨基酸序列QQHYSPPYT (SEQ ID NO:6) 的CDR-L3。在一些实施例中,抗CD38抗体包括包含与SEQ ID NO:7至少90%相同(例如,91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的至少任一者,包括这些值之间的任何范围)的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)。另外或可替代地,在一些实施例中,抗CD38抗体包括包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9至少90%相同(例如,91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的至少任一者,包括这些值之间的任何范围)的氨基酸序列的轻链可变结构域(V_L)。在一些实施例中,抗CD38抗体包括包含SEQ ID NO:7的 V_H 和包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的 V_L 。

QVQLVQSGAE VAKPGTSVKL SCKASGYTFT DYWMQWVKQR PGQGLEWIGT IYPGDGDTGY AQKFQGKATL TADKSSKTVY MHLSSLASED SAVYYCARGD YYGSNSLDYW GQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:7)

DIVMTQSHLS MSTSLGDPVS ITCKASQDVS TVVAWYQQKP GQSPRRLIYS ASYRYIGVPD RFTGSGAGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSPPYTFGG GTKLEIKR (SEQ ID NO:8)

DIVMAQSHLS MSTSLGDPVS ITCKASQDVS TVVAWYQQKP GQSPRRLIYS ASYRYIGVPD RFTGSGAGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSPPYTFGG GTKLEIKR (SEQ ID NO:9)

[0017] 在一些实施例中,抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗(CAS登记号:1461640-62-9)。艾萨妥昔单抗(也被称为hu38SB19和SAR650984)是在WO 2008/047242和美国专利号8,153,765中描述的抗CD38抗体,WO 2008/047242和美国专利号8,153,765两者的内容均通过引用以其全文并入本文。

[0018] 艾萨妥昔单抗的重链包含以下氨基酸序列:

QVQLVQSGAE VAKPGTSVKL SCKASGYTFT DYWMQWVKQR PGQGLEWIGT IYPGDGDTGY AQKFQGKATL TADKSSKTVY MHLSSLASED SAVYYCARGD YYGSNSLDYW GQGTSTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (SEQ ID NO:10) 并且艾萨妥昔单抗的轻链包

含以下氨基酸序列:

DIVMTQSHLS MSTSLGDPVS ITCKASQDVS TVVAWYQQKPGQSPRRLIYS ASYRYIGVPD RFTGSGAGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSPPYTFGGGTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO:11)

[0019] 抗CD38抗体可使用重组方法产生。为了重组产生抗-抗原抗体,分离出编码抗体的核酸并将其插入可复制载体中,以进行进一步的克隆(DNA的扩增)或表达。使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性地结合的寡核苷酸探针)可以容易地分离编码抗体的DNA并测序。许多矢量可供使用。矢量分量通常包括但不限于以下中

的一项或多项:信号序列、复制起始点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体通常被转化到适合表达核酸的宿主细胞中。在一些实施例中,宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在一些实施例中,真核宿主细胞是哺乳动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚胎肾系(被亚克隆用于在悬浮培养中生长的293或293细胞, Graham等人, J. Gen. Virol. [普通病毒学杂志] 36:59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞尔托利氏细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. [生殖生物学杂志] 23:243-251 (1980)); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34); 大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI细胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. [纽约科学院年报] 383:44-68 (1982)); MRC 5细胞; FS4细胞; 以及人肝癌细胞系(Hep G2)。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院学报] 77:4216 (1980)); 以及骨髓瘤细胞系, 例如NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology [分子生物学方法], 第248卷(B.K.C.Lo编辑, Humana Press, Totowa, N.J. [新泽西州托托华市休玛纳出版社], 2003), 第255-268页。由细胞制备的抗CD38抗体可使用例如羟基磷灰石色谱法、疏水相互作用色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法进行纯化, 其中亲和色谱法是典型优选的纯化步骤中的一者。一般来说, 制备用于研究、测试和临床应用的抗体的各种方法在本领域中是公认的, 其与上述方法一致和/或被本领域技术人员视为恰当。

[0020] 在一些实施例中, IL-2类似物是已经聚乙二醇化的IL-2。在一些实施例中, IL-2类似物具有(例如, 包括或包含)非天然氨基酸, 例如N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)。在一些实施例中, 非天然氨基酸利用平均分子量为30kDa的线性PEG基团单独聚乙二醇化。合适的IL-2类似物例如在W02020/163532中有所描述, W02020/163532以其全文并入本文。

[0021] 在一些实施例中, 经修饰使得CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞(NK-CD38K0细胞)与艾萨妥昔单抗和/或IL-2类似物结合使用用于治疗多发性骨髓瘤。此种NK-CD38K0细胞可例如通过在W0 2021087466中描述的方法进行产生, W0 2021087466的教导内容以其全文并入本文。

[0022] 在一些实施例中, 在接受使用抗CD38抗体、IL-2类似物及任选的NK-CD38K0细胞进行的第一个治疗周期之前, 个体已接受了一线或多线用于治疗多发性骨髓瘤的疗法。抗CD38药剂包含例如能够特异性地结合人CD38的单特异性或多特异性结合剂。抗BCMA药剂包含例如能够特异性地结合人BCMA的单特异性或多特异性结合剂。这些结合剂可以是例如单克隆抗体、双特异性或三特异性抗体、或者含有传统抗体的抗原特异性区域的抗体类似物, 这些结合剂可以分别特异性地结合CD38或BCMA。结合剂也可以是抗体-药物偶联物。

药物组合物和制剂

[0023] 本文还提供例如用于治疗多发性骨髓瘤的药物组合物和制剂, 其包含抗CD38抗体(例如, 艾萨妥昔单抗)、IL-2类似物、NK-CD38K0细胞和/或地塞米松。在一些实施例中, 抗CD38抗体、IL-2类似物、NK-CD38K0细胞和任选的地塞米松中的每一者作为单独的药物组合

物提供。在一些实施例中,药物组合物和制剂进一步包含药学上可接受的载体。

[0024] 在一些实施例中,抗CD38抗体呈适合静脉内施用的制剂形式,该制剂例如在pH 6.0下包含约20mg/mL (500mg/25mL) 抗体、约20mM组氨酸、约10% (w/v) 蔗糖、约0.02% (w/v) 聚山梨醇酯80。在一些实施例中,抗CD38抗体呈包含约20mg/mL抗体、约100mg/mL蔗糖、2.22mg/mL组氨酸盐酸盐一水合物、约1.46mg/mL组氨酸和约0.2mg/mL聚山梨醇酯80的制剂形式。在一些实施例中,该制剂包含注射用水(WFI),例如无菌注射用水(SWFI)。在一些实施例中,该制剂是无菌的。在一些实施例中,单次使用的制剂包含5mL的制剂(即,100mg抗CD38抗体)。在一些实施例中,在例如装配有弹性体封盖的16mL型无色透明玻璃小瓶中提供单次使用的5mL制剂。在一些实施例中,已确定了小瓶的填充体积以确保移除5mL。在一些实施例中,填充体积为5.4mL。在一些实施例中,单次使用的制剂包含25mL的制剂(即,500mg抗CD38抗体)。在一些实施例中,在例如装配有弹性体封盖的30mL无色透明玻璃小瓶中提供单次使用的25mL制剂。在一些实施例中,已确定了小瓶的填充体积以确保移除25mL。在一些实施例中,制剂在约2°C与约8°C之间的温度下避光存放时保持稳定持续至少约6个月、12个月、18个月、24个月、30个月或36个月,包括这些值之间的任何范围。在一些实施例中,在0.9%氯化钠或5%右旋糖中将制剂稀释以用于输注。在一些实施例中,稀释的输注溶液在约2°C与约8°C之间保持稳定长达约6小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时或48小时,包括这些值之间的任何范围。在一些实施例中,用于输注的稀释溶液在约2°C与约8°C之间存储后在室温下保持稳定再持续8小时(包括输注时间)。在一些实施例中,用于输注的稀释溶液在光照下是稳定的。在一些实施例中,存储用于输注的稀释溶液的袋由聚烯烃(PO)、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚氯乙烯(PVC)与邻苯二甲酸二(乙基己基)酯(DEHP)或醋酸乙基乙烯酯(EVA)制作而成。在一些实施例中,用于输注的管由PE、PVC(含或不含DEHP)、聚丁二烯(PBD)或聚氨酯(PU)制作而成,带有管路过滤器(聚醚砜(PES)、聚砜或尼龙)。

[0025] 在一些实施例中,抗CD38抗体作为用于皮下施用的制剂被提供。在一些实施例中,抗CD38抗体包含浓度为140mg/mL的艾萨妥昔单抗、9mM的组氨酸、110mM的Arg-C1、2% (w/v) 的蔗糖和0.4% (w/v) 的泊洛沙姆188。

抗CD38抗体联合其他药物用于治疗多发性骨髓瘤的用途

[0026] 本文提供用于与IL-2类似物、经修饰使得CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞(NK-CD38KO细胞)和地塞米松中的一种或多种联合使用用于治疗个体(例如,人类个体)中的多发性骨髓瘤的抗CD38抗体。在一些实施例中,该用途包括向个体施用有效量的抗CD38抗体(例如,包括以下的抗CD38抗体:(a)重链可变结构域(V_H),该重链可变结构域包括:包含氨基酸序列DYWMQ (SEQ ID NO:1)的CDR-H1、包含氨基酸序列TIYPGDGTGYAQKFQG (SEQ ID NO:2)的CDR-H2、以及包含氨基酸序列GDYYGSNSLDY (SEQ ID NO:3)的CDR-H3;以及(b)轻链可变结构域(V_L),该轻链可变结构域包括:包含氨基酸序列KASQDVSTVVA (SEQ ID NO:4)的CDR-L1、包含氨基酸序列SASYRYI (SEQ ID NO:5)的CDR-L2、以及包含氨基酸序列QQHYSPPYT (SEQ ID NO:6)的CDR-L3。在一些实施例中,抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗。

[0027] 在一些实施例中,该方法包括在第一个28天周期的第1天、第8天、第15天和第22天以10mg/kg的剂量向个体施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)、以及在28天周期的第1天和第15天以10mg/kg的剂量施用抗CD38抗体持续至少一个另外的周期。

[0028] 在一些实施例中,该方法包括在28天周期的第1天和第15天以10mg/kg的剂量施用

抗CD38抗体至少11个周期后,在一个或多个另外的28天周期中,每28天一次以10mg/kg的剂量施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)。

[0029] 在一些实施例中,该方法包括在受试者在使用抗CD38抗体进行治疗的同时已达到至少非常好的部分缓解(VGPR)后,在一个或多个另外的28天周期中,每28天一次以10mg/kg的剂量施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)。

[0030] 在一些实施例中,该方法包括在受试者在使用抗CD38抗体进行治疗的同时已达到MRD阴性后,在一个或多个另外的28天周期中,每28天一次以10mg/kg的剂量施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)。

[0031] 在一些实施例中,该方法包括在受试者在使用抗CD38抗体进行治疗的同时已达到MRD阴性后,在一个或多个另外的28天周期中,每28天一次以10mg/kg的剂量施用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)。

[0032] 在本文所述的一些实施例中,IL-2类似物是被修饰为包含非天然氨基酸N6-((2-叠氮乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)的IL-2,且其中AzK是聚乙二醇化的。在一些实施例中,IL-2类似物每两周施用一次,或者每三周施用一次,或以其组合形式施用。在一些实施例中,IL-2类似物以24ug/kg的剂量施用。在一些实施例中,IL-2类似物以32ug/kg的剂量施用。在一些实施例中,IL-2类似物以16ug/kg的剂量施用。

[0033] 在一些实施例中,本文所述的治疗方案延长了个体的无进展生存(PFS)。

[0034] 在一些实施例中,多发性骨髓瘤是冒烟型多发性骨髓瘤(SMM)。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是新诊断的多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是复发性和/或难治性多发性骨髓瘤(RRMM)。在一些实施例中,个体接受了1种、2种或3种针对多发性骨髓瘤的先前疗法。在一些实施例中,个体接受了超过三种针对多发性骨髓瘤的先前疗法。在一些实施例中,个体接受了使用蛋白酶体抑制剂进行的先前疗法。在一些实施例中,个体接受了使用免疫调节剂进行的先前疗法。在一些实施例中,个体未接受过使用抗CD38抗体进行的先前治疗。

[0035] 在一些实施例中,个体已经接受过使用抗CD38抗体进行的先前治疗。在一些实施例中,先前的抗CD38抗体是达雷木单抗。在一些实施例中,先前的抗CD38抗体是艾萨妥昔单抗。

制品或试剂盒

[0036] 在本发明的另一个实施例中,提供一种包含抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)的制品或试剂盒。在一些实施例中,该制品或试剂盒进一步包含至少一种另外的药物(例如,IL-2类似物、NK-CD38K0细胞或地塞米松中的一者或多者)。在一些实施例中,该制品或试剂盒进一步包括包装说明书,该包装说明书包括根据本文所述的用途使用抗CD38抗体(例如,艾萨妥昔单抗)和其他药物治疗多发性骨髓瘤(例如,冒烟型多发性骨髓瘤、新诊断的多发性骨髓瘤、难治性多发性骨髓瘤、或复发性和难治性多发性骨髓瘤)或延缓多发性骨髓瘤的进展的说明。

定义

[0037] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用,除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“分子”任选地包括两个或更多个这样的分子的组合等。

[0038] “持续缓解”是指停止治疗后对预防或延缓疾病(例如,多发性骨髓瘤)的进展和/或改善一个或多个缓解标准的持续效果。例如,可根据在以下文献中所述的标准来衡量对多发性骨髓瘤治疗的缓解:Kumar等人(2016)“International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma.[国际骨髓瘤工作组关于多发性骨髓瘤中的缓解和最小残留疾病评估的共识标准]”Lancet Oncol.[柳叶刀肿瘤学]17(8):e328-e346和Durie等人(2006)“International uniform response criteria for multiple myeloma.[多发性骨髓瘤的国际统一缓解标准]”Leukemia.[白血病]20:1467-1473。(另参见下表A。)在一些实施例中,持续缓解的持续时间至少与治疗持续时间相同,至少是治疗持续时间的1.5X、2.0X、2.5X或3.0X。

表A标准国际骨髓瘤工作组(IMWG)缓解标准

缓解	IMWG 标准
完全缓解 (CR)	•血清和尿液呈阴性免疫固定, 且 •任何软组织浆细胞瘤消失, 且

	•骨髓穿刺液中浆细胞< 5%。 需要进行两次连续的评估。如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据
严格完全缓解 (sCR)	以上定义的 CR 加上： •正常的游离轻链比 (0.26 到 1.65)，且 •免疫组织化学检测骨髓中无克隆细胞 (在计数≥ 100 个浆细胞后，分别针对 κ 和 λ 患者，κ/λ 比率$\leq 4:1$ 或$\geq 1:2$)。 需要对实验室参数进行两次连续的评估。如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据
非常好的部分缓解 (VGPR)	•血清和尿液 M 蛋白可通过免疫固定检测到，但无法通过电泳检测到，或者 •血清 M 蛋白加尿液 M 蛋白水平降低$\geq 90\% < 100$ mg/24 小时。 •在软组织浆细胞瘤中，与基线相比，最大垂直直径 (SPD) 的乘积之和减小$\geq 90\%$。 需要进行两次连续的评估。如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据。
部分缓解 (PR)	•血清 M 蛋白降低$\geq 50\%$，且 24 小时尿 M 蛋白减少$\geq 90\%$或减少到< 200 mg/24 小时 •除以上所列标准之外，如果在基线处存在软组织浆细胞瘤，还需要软组织浆细胞瘤的大小 (最大垂直直径或“SPD”的乘积之和) 减小$\geq 50\%$ 需要进行两次连续的评估。如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据。
最小缓解 (MR)	血清 M 蛋白减少$\geq 25\%$但$\leq 49\%$，且 24h 尿液 M 蛋白减少 50%到 89%，仍超过 200 mg/24 小时。 除以上所列标准之外，如果在基线处存在软组织浆细胞瘤，还需要软组织浆细胞瘤的大小 (SPD) 减小$\geq 50\%$。 需要进行两次连续的评估。如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据。
病情稳定	•不符合 CR、VGPR、PR、MR 或疾病进展的标准。

(SD)	如果进行了放射学研究，则没有已知的疾病进展或新骨骼病变的证据。
疾病进展 (PD)	以下标准中的任何一项或多项： 在以下标准中的任一项中，从最低确认值增加$\geq 25\%$： •血清 M 蛋白（绝对增加量必须≥ 0.5 g/dL）。 •如果最低 M 组分≥ 5 g/dL，则血清 M 蛋白增加≥ 1 g/dL。 •尿液 M 组分（绝对增加量必须≥ 200 mg/24 小时）。 出现新病变，病变> 1 处时 SPD 从最低点增加$\geq 50\%$，或前一病变的短轴最长直径> 1 cm 增加$\geq 50\%$。 需要对 M 蛋白的 PD 进行两次连续的评估。

†SPD，所测量病变的最大垂直直径的乘积之和

[0039] 测量血清和尿液M蛋白水平的方法在本领域中是众所周知的，并在例如以下文献中进行了描述：Jenkins (2009) Clin Biochem Rev. [临床生物化学综述] 30 (3) :119-122；Leung, Nelson “Chapter 8: Clinical Tests for Monoclonal Proteins. [第8章：单克隆蛋白的临床试验]” Onco-Nephrology Curriculum, American Society of Nephrology [肿瘤肾脏病课程，美国肾脏病学会] 2016，第1-5页。

[0040] 在一些实施例，根据在以下文献中所述的标准来评估VGPR：Kumar等人 (2016) “International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. [国际骨髓瘤工作组关于多发性骨髓瘤中的缓解和最小残留疾病评估的共识标准]” Lancet Oncol. [柳叶刀肿瘤学] 17 (8) :e328-e346和Durie等人 (2006) “International uniform response criteria for multiple myeloma. [多发性骨髓瘤的国际统一缓解标准]” Leukemia. [白血病] 20:1467-1473，所述文献的内容通过引用以其全文并入本文。(另参见表A。)

[0041] 术语“药物制剂”是指一种配制剂，其形式允许活性成分的生物活性有效，并且不含对将被施用制剂的受试者有不可接受毒性的另外的组分。此种制剂是无菌的。“药上可接受的”赋形剂 (赋形药、添加剂) 是指可合理地施用给受试哺乳动物以提供所用活性成分的有效剂量的赋形剂。

[0042] 如本文所使用，术语“治疗”是指被设计为在临床病理学期间改变正在治疗的疾病或细胞 (例如，癌症细胞) 的自然过程的临床干预。治疗的可取效果包括降低疾病进展率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。举例来说，如果减轻或消除了与癌症相关的一种或多种症状 (包括但不限于：减少癌细胞的增殖 (或破坏癌细胞)、减少由疾病引起的症状、提高患有疾病的患者的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药剂的剂量和/或延长个体的生存)，则个体成功地得到了“治疗”。

[0043] 如本文所使用，“延缓疾病进展”是指延迟、阻碍、减缓、减慢、稳定和/或推迟疾病 (例如，癌症) 的发展。此种延缓的时间长度可依疾病史和/或接受治疗的个体而有所不同。如对本领域技术人员显而易见，充分或显著的延缓实际上可包括预防，因为个体不会患上

疾病。举例来说,晚期癌症(例如,转移的发展)可被延缓。

[0044] “有效量”至少是实现特定病症的可测量的改善或预防所需的最小量。本文中的有效量可根据例如个体/患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引发期望缓解的能力等因素而变化。有效量也是其中治疗有益作用胜过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防性用途,有益或期望的结果包括例如以下结果:消除或降低风险、减轻严重程度或延缓疾病的发作,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症和在疾病的发展期间出现的中间病理表型。对于治疗性用途,有益或期望的结果包括例如以下临床结果:减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患有疾病的患者的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药剂的剂量、例如通过靶向来增强另一种药剂的效果、延缓疾病的进展和/或延长生存。在癌症或肿瘤的情形中,有效量的药物可在以下方面具有效果:减少癌细胞数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减缓或期望地停止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,在一定程度上减缓并期望地停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻与病症相关的一种或多种症状。有效量可以一次或多次施用来施用。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防性或治疗性治疗的量。如在临床背景下所理解,有效量的药物、化合物或药物组合物可与另一种药物、化合物、或药物组合物结合使用,也可以不结合使用。因此,在施用一种或多种治疗剂的背景下可考虑“有效量”,且如果与一种或多种其他药物结合可以或已经达到期望的结果,则可以考虑以有效量给予单一药物。

[0045] 如本文所使用,“结合”是指除一种治疗方式外,还施用另一种治疗方式。因此,“结合”是指在向个体施用一种治疗方式之前、期间或之后施用另一种治疗方式。

[0046] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”是指任何被归类为哺乳动物的动物,包括人类、家畜和农场动物、以及动物园动物、体育运动动物或宠物动物,例如狗、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物是人类。

[0047] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,且具体包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要这些抗体表现出期望的生物活性即可。

[0048] 人轻链通常被分类为 κ 和 λ 轻链,且人重链通常被分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有几个亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有多个亚类,包括但不限于IgM1和IgM2。IgA类似地被细分为多个亚类,包括但不限于IgA1和IgA2。在全长轻链和重链内,可变结构域和恒定结构域通常由约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约10个以上氨基酸的“D”区。参见例如Fundamental Immunology[基础免疫学](Paul, W. 编辑, Raven Press[雷文出版社], 第2版, 1989), 该文献出于所有目的通过引用以其全文并入本文。每个轻/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。抗体的可变结构域通常表现出由三个高变区(也被称为互补决定区或CDR)接合的相对保守的框架区(FR)的相同总体结构。每对两条链的CDR通常由框架区排列,此可使得能够结合到特定的表位。从氨基末端到羧基末端,轻链可变结构域和重链可变结构域两者通常依次包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0049] 术语“CDR集”是指出现在能够结合抗原的单个可变区中的一组三个CDR。这些CDR的确切边界已根据不同系统进行了不同定义。Kabat描述的系统(Kabat等人, Sequences of

Proteins of Immunological Interest[免疫学上感兴趣的蛋白质序列](马里兰州贝塞斯达美国国立卫生研究院(National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1987)和(1991))不仅提供了适用于抗体任何可变区的明确残基编号系统,而且提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可被称为Kabat CDR。

[0050] 本文使用的术语“Fc”是指将由抗体消化产生或通过其他手段产生的非抗原结合片段的序列(不论呈单体形式还是多聚体形式),并且可含有铰链区。天然Fc的原始免疫球蛋白来源优选地是人源的,并且可以是任何免疫球蛋白。Fc分子由单体多肽构成,这些单体多肽可通过共价(即,二硫键)和非共价缔合连接成二聚体或多聚体形式。根据类别(例如,IgG、IgA和IgE)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgA2和IgA4),天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键的数量介于1到4的范围内。Fc的一个实例是由IgG的木瓜蛋白酶消化产生的二硫键键合的二聚体。如本文所使用,术语“天然Fc”是单体、二聚体和多聚体形式的通称。

[0051] 如本文所使用,术语“总体缓解率”或“ORR”是指由IRC使用在以下文献中所述的IMWG缓解标准而评估的具有严格完全缓解(sCR)、完全缓解(CR)、非常好的部分缓解(VGPR)和部分缓解(PR)的个体/患者的比例:Kumar等人(2016)“International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma.”[国际骨髓瘤工作组关于多发性骨髓瘤中的缓解和最小残留疾病评估的共识标准]Lancet Oncol.[柳叶刀肿瘤学]17(8):e328-e346和Durie等人(2006)“International uniform response criteria for multiple myeloma.[多发性骨髓瘤的国际统一缓解标准]Leukemia.[白血病]20:1467-1473。另参见本文中的表A。

[0052] 该说明书被视为足以使得本领域技术人员能够实践本发明。除了本文所示和所述的内容之外,本发明的各种修改形式对于本领域技术人员来说通过以上说明将变得显而易见,并且落入所附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请均出于所有目的通过引用以其全文并入本文。

实例

[0053] 通过参考下述实例将更全面地理解本披露。然而,这些实例不应被解释为限制本发明的范围。应理解,本文所述的实例和实施例仅用于说明性目的,并且根据所述实例和实施例进行的各种修改或改变将是本领域技术人员所想到的并且应包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求书的范围内。

实例1:

体外细胞毒性活性的测定

抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0054] 通过 **Incucyte®** 活细胞成像和分析系统(森西生物科技公司(Essen Bioscience))随时间测定了使用WT或CD38KO K-NK细胞(效应细胞)联合艾萨妥昔单抗和SAR444245(聚乙二醇化的IL-2类似物)针对LP-1RFP多发性骨髓瘤细胞(靶细胞)的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0055] 通过利用 **Incucyte®** Nuclight红色慢病毒(赛多利斯公司(Sartorius))感染LP-1细胞(DSMZ公司)以表达红色荧光蛋白(RFP)而产生了LP-1RFP细胞。将LP-1RFP细胞维持在补充有20%胎牛血清(热灭活的FBS,伯尔韦斯特公司(Biowest),#S181H-100)、1% L-谷氨

酰胺(吉布科公司(Gibco), #25030-024)的IMDM培养基(吉布科公司(Gibco), #12440053)中,并在37℃和5% CO₂下进行孵育。将LP-1RFP细胞以300g离心了5分钟,重悬在RPMI1640完全培养基(补充有10%胎牛血清-FBS,伯尔韦斯特公司(Biowest), #S181H-100-、1% L-谷氨酰胺-吉布科公司(Gibco), #25030-024的RPMI1640)中,然后加入**Incucyte®**板中(详情如下)。

[0056] 使用从两个健康供体(BC45和BC50)分离的外周血NK细胞产生了CD38的表达减少或被敲除的自然杀伤(NK)细胞(CD38KO K-NK细胞),并使用PM21颗粒技术进行扩增以产生高度活化的K-NK细胞。BC45细胞具有CD16的V/V表型,而BC50细胞具有F/V表型。

[0057] 为了产生CD38KO K-NK细胞,在NK细胞扩增期间,通过对靶向CD38的Cas9/RNP复合物进行电穿孔而应用了CRISPR基因编辑。在扩增后,将WT和CD38KO K-NK细胞冷冻并保存在-150℃下。将WT和CD38KO K-NK细胞解冻,接种在补充有50U/mL的IL-2(派普泰克公司(Peprotech), #200-02)的RPMI1640完全培养基中,并在37℃和5% CO₂下孵育了16-20小时。然后以300g将细胞离心了5分钟,然后加入**Incucyte®**板中。

[0058] 按以下顺序将化合物和细胞加入**Incucyte®**板(聚-D赖氨酸处理的96孔平底微板CellCoat™,葛莱娜第一生化有限公司(Greiner Bio-One); #655946)的适当孔中(每一孔的最终体积:200μl):

[0059] 将艾萨妥昔单抗(或同种型对照)(先前已在RPMI1640完全培养基中稀释)加入适当的孔中以达到0.1、1或10ng/ml (50μl/孔)的最终浓度。

[0060] 然后将SAR444245(先前已在RPMI1640完全培养基中稀释)加入适当的孔中以达到333,33ng/ml (50μl/孔)的最终浓度。

[0061] 然后将LP-1RFP细胞(靶细胞,T)加入每一孔中(以达到20000个LP1-RFP细胞/孔)(50μl/孔)。

[0062] 然后将WT或CD38KO K-NK细胞(效应细胞,E)加入到适当的孔中。加入20000、60000或100000个细胞以评估不同的E:T比(分别为1:1、3:1和5:1)(50μl/孔)。

[0063] 然后将**Incucyte®**板以100g离心了1分钟,然后放入**Incucyte®**(IncucyteS3,森西生物科技公司(EssenBio))中,将**Incucyte®**放置在37℃下的含有5% CO₂的专用孵育箱内。使用10X物镜和使用相位和红色通道的标准扫描类型,每2小时拍摄图像(4个图像/孔)。通过荧光成像监测LP-1RFP靶细胞的生长多达90小时,且使用IncucyteS3软件对活靶细胞的数量进行了量化,并将其正规化为时间零点活靶细胞的数量。

[0064] 利用来自两个供体(BC45和BC50)的WT和CD38KO K-NK细胞进行了至少2次实验,每种条件一式两份。

自相残杀效应

[0065] 将WT和CD38KO K-NK细胞解冻,接种在另外补充有50U/mL的IL-2(派普泰克公司(Peprotech), #200-02)的RPMI1640完全培养基(补充有10%胎牛血清-FBS,伯尔韦斯特公司(Biowest), #S181H-100-、1%L-谷氨酰胺-吉布科公司(Gibco), #25030-024的RPMI1640)中,并在37℃和5% CO₂下孵育了16-20小时。然后将细胞以300g离心了5分钟,进行计数,并重悬在RPMI1640完全培养基中,以达到50000个K-NK细胞/50μl。

[0066] 按以下顺序将化合物和细胞加入Corning™96孔透明超低附着微板(康宁公司

(Corning), #7007) 的适当孔中 (每一孔的最终体积: 200 μ l) :

[0067] 向每一孔中加入RPMI1640完全培养基 (100 μ l/孔)。

[0068] 将艾萨妥昔单抗 (或同种型对照) (先前已在RPMI1640完全培养基中稀释) 加入适当的孔中以达到10ng/ml (50 μ l/孔) 的最终浓度。

[0069] 然后将WT或CD38KO K-NK细胞加入适当的孔中 (以达到50000个K-NK细胞/孔) (50 μ l/孔)。

[0070] 然后将该板以100g离心了1分钟, 然后将其放入37 $^{\circ}$ C下的含有5% CO₂的孵育箱中4小时。

[0071] 为了对自相残杀进行量化, 利用膜联蛋白V-FITC试剂盒或利用DiOC6/DRAQ7对WT和CD38KO K-NK细胞进行了染色。

[0072] 对于利用膜联蛋白V-FITC试剂盒 (美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec); #130-092-052) 进行标记:

[0073] 在4小时孵育之后, 将板以300g离心了5分钟, 移除了培养基, 并将球粒重悬在200 μ L的膜联蛋白V-FITC试剂盒缓冲溶液中。以300g将该板再次离心了5分钟。

[0074] 移除了缓冲液, 然后将球粒重悬在100 μ L的膜联蛋白V-FITC试剂盒缓冲溶液中, 并将5 μ L的膜联蛋白V-FITC加入适当的孔中。

[0075] 将该板在室温下黑暗中孵育了15分钟。

[0076] 加入了100 μ L的膜联蛋白V-FITC试剂盒缓冲溶液, 且将板以300g离心了5分钟, 且移除了缓冲液。

[0077] 将球粒重悬在200 μ L的膜联蛋白V-FITC试剂盒缓冲溶液中, 且以300g将板再次离心了5分钟。

[0078] 移除了缓冲液, 并将球粒重悬在100 μ L的膜联蛋白V-FITC试剂盒缓冲溶液中。

[0079] 紧接在分析之前, 将1 μ L的碘化丙啶 (PI) 加入到适当的孔中。

[0080] 然后利用MACSQuant 16流式细胞仪 (美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec)) 分析了样本。

使用以下策略利用VenturiOne软件分析了数据:

[0081] 对不包括碎片的K-NK细胞群体进行门控, 然后对单细胞进行门控。从单细胞中, 对可存活PI^{neg}和膜联蛋白V-FITC^{neg}细胞进行了量化。

[0082] 对于图形表示, 将可存活K-NK细胞 (膜联蛋白V^{neg}/PI^{neg}) 量化为在存在艾萨妥昔单抗的情况下可存活细胞的百分比, 此百分比被正规化为在存在同种型对照的情况下可存活细胞的百分比 (100%) (参见图1)。

[0083] 对于利用DiOC6/DRAQ7进行标记:

[0084] 在4小时孵育之后, 将20 μ L的100nM DiOC6 (3,3'-二己氧基羰花青碘化物, 赛默飞世尔科技公司 (ThermoFisher), #D273) 加入适当的孔中。

[0085] 将板在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下孵育了20分钟。

[0086] 然后以300g将板离心了5分钟, 移除了培养基, 并将球粒重悬在100 μ L的3 μ M DRAQ7 (BD生物科学事业部 (BD Biosciences), #564904) 中。

[0087] 然后利用MACSQuant 16流式细胞仪 (美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec)) 分析了样本。

使用以下策略利用VenturiOne软件分析了数据:

[0088] 对不包括碎片的K-NK细胞群体进行门控,然后对单细胞进行门控。从单细胞中,对可存活DiOC6pos和DRAQ7neg细胞进行了量化。

[0089] 对于图形表示,将可存活K-NK细胞 (DiOC6pos/DRAQ7neg) 量化为在存在艾萨妥昔单抗的情况下可存活细胞的百分比,此百分比被正规化为在存在同种型对照的情况下可存活细胞的百分比(100%) (图2)。

[0090] 利用来自两个供体 (BC45和BC50) 的WT和CD38K0 K-NK细胞进行了实验。如图1所示,在存在艾萨妥昔单抗的情况下,利用CD38 K0 K-NK细胞 (具有F/V CD16表型的BC50) 会避免自相残杀效应。如图2所示,在存在艾萨妥昔单抗的情况下,利用CD38 K0 K-NK细胞 (具有V/V CD16表型的BC45) 会避免自相残杀效应。此外,在存在野生型NK细胞的情况下, SAR444245的存在增强了艾萨妥昔单抗针对LP-1细胞的细胞毒性活性,且在存在CD38 K0 K-NK细胞的情况下,艾萨妥昔单抗的细胞毒性活性甚至进一步增强。CD38 K0 K-NK细胞的细胞毒性活性持续了一段时间,最长多达90小时。

[0091] 除非清楚地指示相反的情况,否则本文中所描述的每一实施例可与任何其他一或多个实施例组合。具体来说,除非清楚地指示相反的情况,否则被指示为优选的或有利的任何特征或实施例可与被指示为优选的或有利的任何其他一或多个特征或者一或多个实施例组合。

[0092] 将本申请中引用的所有参考文献通过引用明确地并入本文。

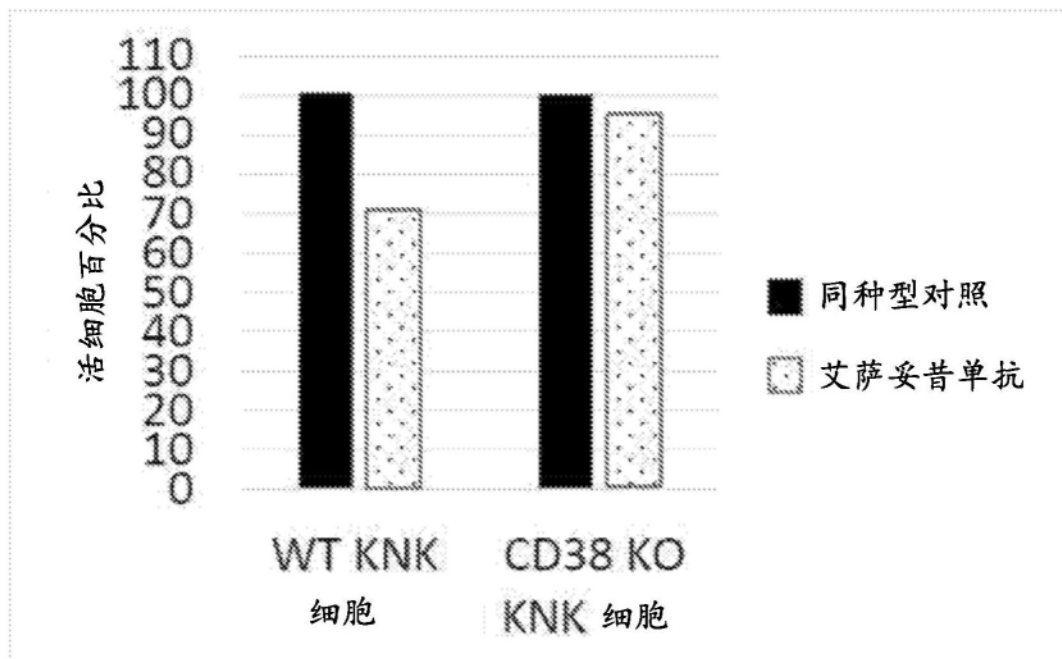
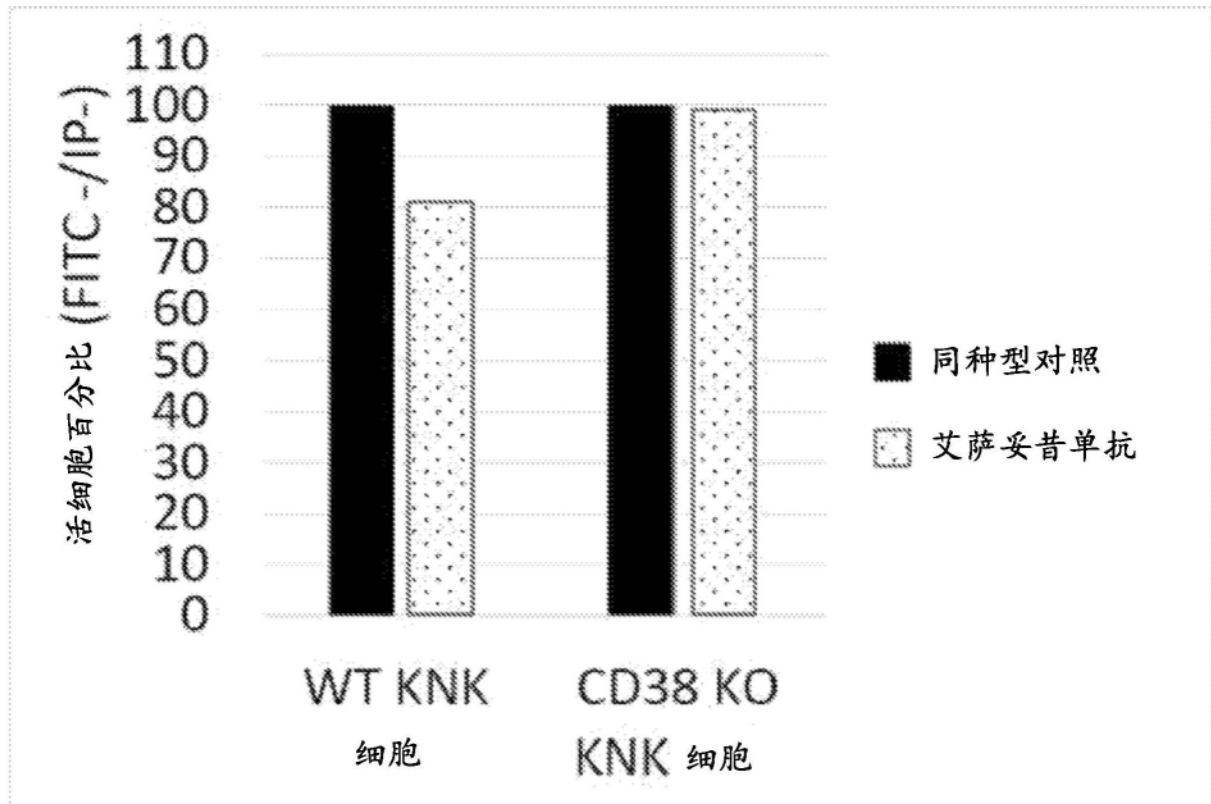


图1

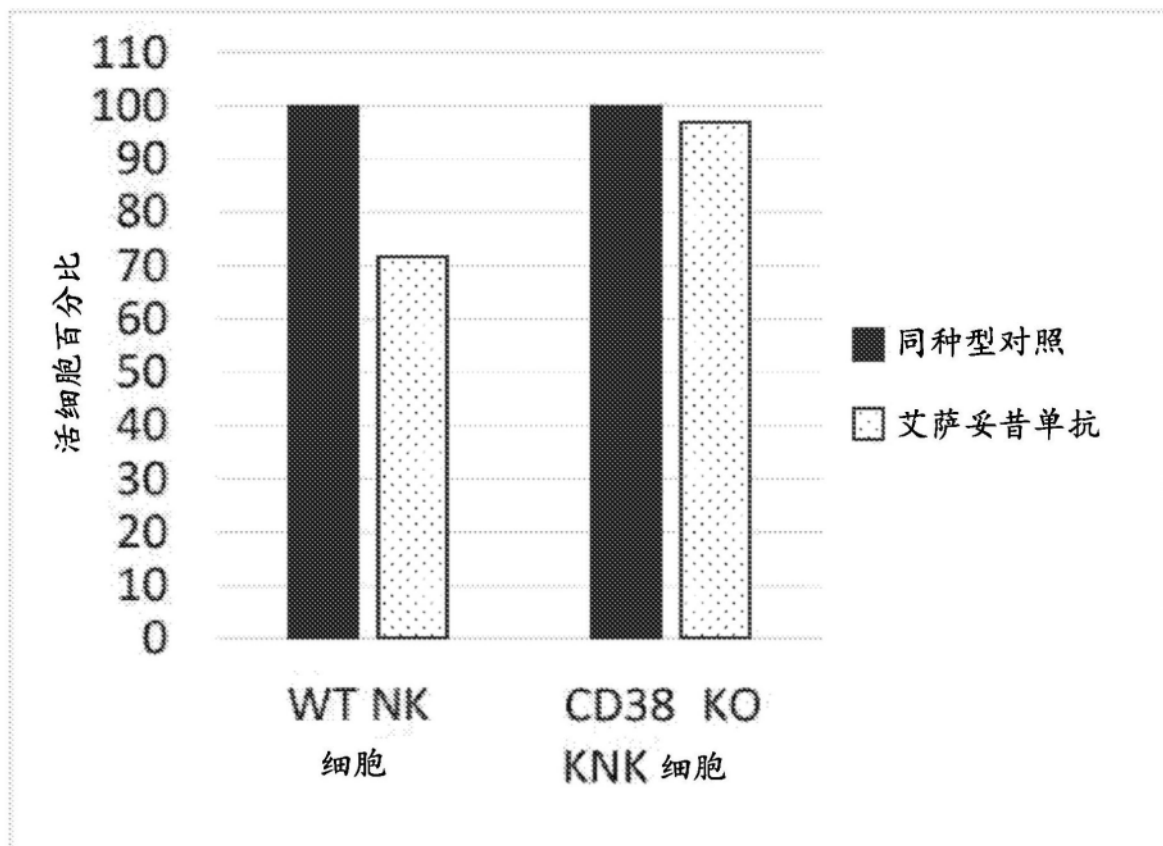
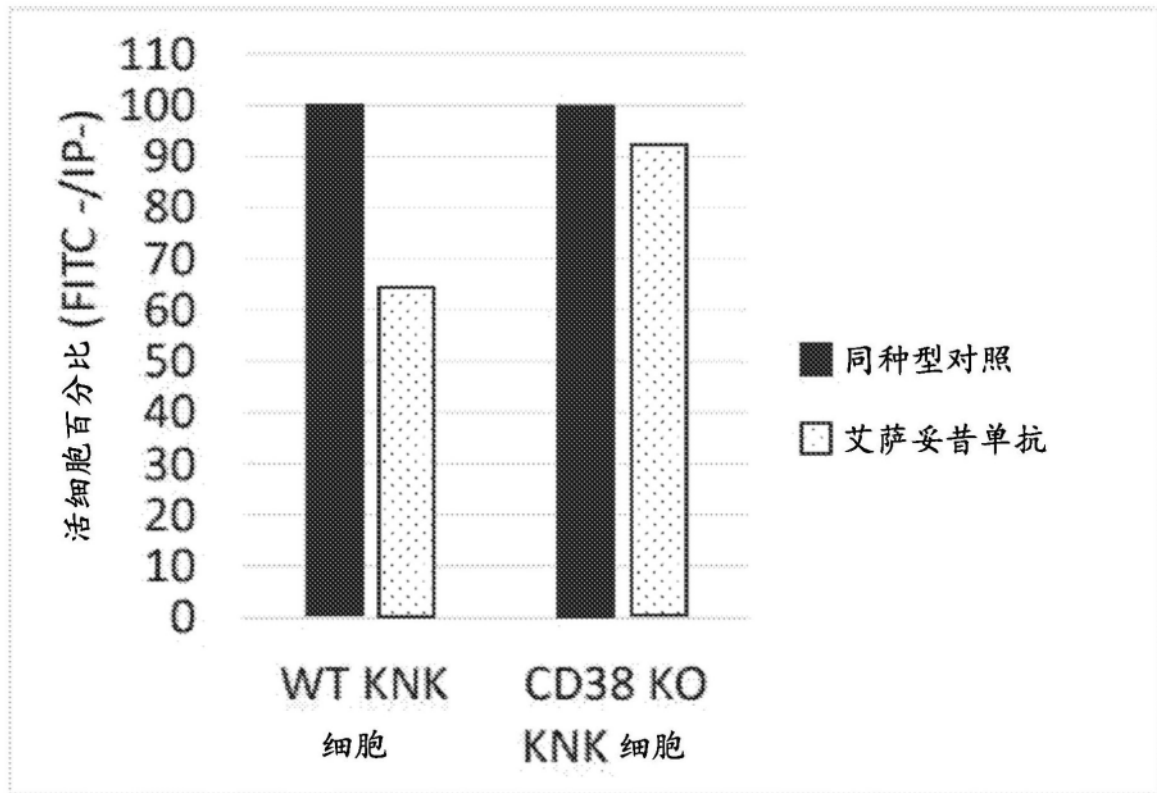


图2