

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040320**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.19

(51) Int. Cl. **G01N 33/574 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201892542

(22) Дата подачи заявки
2017.05.30

(54) СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К CD19

(31) 16171885.3

(32) 2016.05.30

(33) EP

(43) 2019.06.28

(86) PCT/EP2017/063045

(87) WO 2017/207574 2017.12.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МОРФОСИС АГ (DE)

(72) Изобретатель:
**Энделль Ян, Виндерлих Марк,
Боксхаммер Райнер (DE)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев
А.В. (RU)**

(56) US-A1-2014328842

WOYACH J A ET AL.: "A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 124, no. 24, 4 December 2014 (2014-12-04), pages 3553-3560, XP002737891, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2014-08-593269 [retrieved on 2014-10-09] the whole document In particular: Title; Abstract; Patients and methods section; Page 3557-3558, bridging paragraph.

US-A1-2015239974

(57) Настоящее изобретение направлено на способ идентификации субъекта, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL) или острый лимфобластный лейкоз (ALL), который отвечает на лечение антителом к CD19, при этом указанный способ включает а) взятие образца крови, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19, б) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из i) количества периферических NK-клеток и ii) уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, с) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсечения, где уровни указанного по меньшей мере одного биомаркера, соответствующие заданному уровню отсечения или превышающие его, указывают на субъекта, который получит пользу от лечения антителом к CD19. Настоящее изобретение также направлено на способ отбора пациента для лечения в соответствии с вышеизложенным и на применение антитела к CD19 для лечения такого пациента.

B1

040320

040320

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение направлено на идентификацию у пациентов, которые получают пользу от лечения антителами к CD19, характеристик и биомаркеров.

Предпосылки создания изобретения

CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин размером 95 кДа надсемейства иммуноглобулинов, содержащий два внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена и крупный цитоплазматический хвост. Белок является поверхностным рецептором для всех типов В-лимфоцитов и повсеместно экспрессируется с самых ранних стадий развития пре-В-клеток вплоть до тех пор, пока он не будет подавлен во время терминальной дифференцировки в плазматические клетки. Он является специфичным для линии В-лимфоцитов и не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках и других иммунных клетках, за исключением некоторых фолликулярных дендритных клеток. CD19 функционирует как положительный регулятор передачи сигналов В-клеточного рецептора (BCR) и имеет большое значение для активации и пролиферации В-клеток и при развитии типов гуморального иммунного ответа. Он действует как ко-стимулирующая молекула в сочетании с CD21 и CD81 и имеет решающее значение для ответов с участием В-клеток на зависимые от Т-клеток антигены. Цитоплазматический хвост CD19 физически связан с семейством тирозинкиназ, которые запускают нижерасположенные сигнальные пути посредством src-семейства протеинтирозинкиназ. CD19 является привлекательной мишенью при типах рака лимфоидного происхождения, поскольку он экспрессируется на высоком уровне почти при всех хронических лимфоцитарных лейкозах (CLL) и неходжкинских лимфомах (NHL), а также при многих других различных типах лейкозов, в том числе остром лимфоцитарном лейкозе (ALL) и лейкозе ворсинчатых клеток (HCL).

Клиническая разработка направленных на CD19 антител ранее была ограничена интернализацией антигена CD19, однако улучшенная технология модификации антител позволила вернуть эту потенциальную терапевтическую мишень. MOR00208 (ранее называемое XmAb5574) представляет собой полученное с помощью генной инженерии гуманизированное моноклональное Fc-антитело, которое связывает CD19. Повышение степени связывания Fc MOR00208 с FcγR, вследствие полученных с помощью генной инженерии мутаций XmAb, значительно усиливает *in vitro* антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и прямые цитотоксические эффекты (апоптоз) в отношении опухоли по сравнению с немодифицированным антителом. Не было показано, что MOR00208 опосредует комплементзависимую цитотоксичность.

MOR00208 проходило и в настоящее время проходит клинические испытания в отношении CLL, ALL и NHL. В частности, завершены фаза I испытания под названием "Безопасность и переносимость XmAb@5574 при хроническом лимфоцитарном лейкозе" и фаза IIa испытания под названием "Исследование Fc-оптимизированного антитела к CD19 (MOR00208) для лечения В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL)". Завершен набор на фазу IIa испытания под названием "Исследование Fc-оптимизированного антитела к CD19 (MOR00208) для лечения неходжкинской лимфомы (NHL)". Также запланированы/продолжаются следующие испытания: фаза II/III испытания под названием "Испытание для оценки эффективности и безопасности MOR00208 с бендамустином (BEN) в сравнении с ритуксимабом (RTX), с BEN у взрослых пациентов с рецидивирующей или рефрактерной диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL) (B-MIND)", фаза II испытания под названием "Исследование для оценки эффективности и безопасности MOR00208 с иделалисибом у пациентов с R/R CLL/SLL, предварительно получавших ВТКi", фаза II испытания под названием "Исследование для оценки безопасности и эффективности леналидомида с MOR00208 у пациентов с R-R DLBCL" и фаза II испытания под названием "Фаза II, MOR00208 в комбинации с леналидомидом для пациентов с рецидивирующим или рефрактерным CLL, SLL или PLL или пожилых пациентов с CLL, SLL или PLL без лечения". В ходе еще одной проходящей в настоящее время фазы II испытания (COSMOS) изучают эффективность и безопасность MOR00208 в комбинации с иделалисибом или венетоклаксом у пациентов с рецидивирующим или рефрактерным CLL, SLL.

Сообщалось об эффективности монотерапии с использованием MOR00208 при CLL и NHL. Однако общие переменные значения частоты ответа у пациентов на различные виды терапии моноклональными антителами указывают на то, что необходимы способы для точного прогнозирования того, какие пациенты могут отвечать на такие виды терапии антителами, чтобы это лечение можно было назначать тем пациентам, которые, скорее всего, получают положительные результаты. Можно найти специфические биомаркеры или характеристики пациентов, для которых определенная концентрация или диапазон каждого биомаркера коррелирует с восприимчивостью такой терапии.

Оценивали влияние количества клеток натуральных киллеров (NK) на выживаемость пациентов с DLBCL, получающих лечение ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином гидрохлоридом (гидроксидоануомицином), винкристином сульфатом (онковином) и преднизолоном (R-CHOP). Kim et al., Blood Research, 49:3, 162-169 (сентябрь 2014 г.). Ранее сообщалось, что количество периферических NK-клеток связано с клиническим исходом у пациентов с DLBCL с aalPI 2-3. Plonquet et al., Ann Oncol 2007; 18:1209-15.

Понятно, что необходимы значительные усилия и инвестиции для выявления и идентификации таких характеристик и биомаркеров пациентов, с помощью которых прогнозируют эффективность.

Краткое описание изобретения

MOR00208 изучали с участием пациентов с CLL, ALL, NHL и SLL. Соответственно к настоящему времени был проведен тщательный анализ клинических данных с целью идентификации характеристик или биомаркеров пациентов, которые с большей вероятностью получают пользу от лечения с помощью MOR00208.

MOR00208 специфически нацелено на поверхностный антиген CD19 и опосредует прямой цитолитический эффект опухолевых клеток посредством своей усиленной эффекторной функции ADCC. Было показано, что в доклинических исследованиях MOR00208 значительно усиливает ADCC, ADCP и прямые цитотоксические эффекты (апоптоз) *in vitro* в отношении линий опухолевых клеток CD19+, охватывающих широкий диапазон лимфом и лейкозов человека (лимфому Беркитта, CLL, лейкоз ворсистых клеток (HCL), CD19+ хронический миелоидный лейкоз (CML), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и острый лимфобластный лейкоз (ALL)), экспрессирующих уровни антигена CD19 в диапазоне от 15000 до 105000 молекул/клетка. Аналогичные эффекты наблюдали и в отношении свежеевыделенных клеток пациентов с CLL или ALL, а также ожидается, что их можно транслировать на клетки первичной неходжкинской лимфомы (NHL), так как диапазон экспрессии, зарегистрированный для В-клеток при ALL и CLL, охватывает диапазон, наблюдаемый для В-клеток при NHL (Ginaldi et al., 1998; Olejniczak et al., 2006). Основываясь на широкой и однородной поверхностной экспрессии CD19 среди различных типов В-клеточных новообразований, эффект MOR00208 в настоящем исследовании можно перенести на широкий диапазон лимфом и лейкозов человека, таких как CLL, ALL, NHL и SLL и их подтипы.

Подробно проанализированы данные фазы IIa испытания под названием "Исследование Fc-оптимизированного антитела к CD19 (MOR00208) для лечения неходжкинской лимфомы (NHL)". В результате этих усилий описанное ниже изобретение предусматривает характеристики и биомаркеры пациентов, для которых антитела к CD19 являются эффективными.

В частности, оценивали, по меньшей мере, следующие характеристики пациентов: а) возраст, б) пол, с) получали ли пациенты дозу ритуксимаба в течение последних 6 месяцев, d) были ли пациенты резистентными к ритуксимабу, е) имеют ли пациенты аллель FCgammaRIIIa высокой или низкой аффинности, ф) имеют ли пациенты аллель FCgammaRIIIa высокой или низкой аффинности, г) была ли у пациентов длительность ответа на предыдущее лечение большей, чем 12 месяцев, h) исходное количество периферических Т-клеток (клетки/мкл), i) исходное количество периферических NK-клеток (клетки/мкл) и j) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках (количество связанных антител на клетку - ABC).

Как 1) исходные количества периферических NK-клеток, так и 2) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках показали явные корреляции с ответами пациентов на терапию с использованием MOR00208. В частности, у пациентов с более высоким исходным количеством периферических NK-клеток на мкл наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR). DCR включает пациентов, характеризующихся полным ответом (CR) + частичным ответом (PR) + стабильным заболеванием (SD). Кроме того, у таких пациентов наблюдали значительно лучшую выживаемость без прогрессирования (PFS) по сравнению с пациентами с более низкими количествами NK-клеток. В дополнение, у пациентов с исходным уровнем экспрессии CD16 на NK-клетках, составляющим по меньшей мере 60000 (ABC), наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR).

Таким образом, пациенты с диагнозом CLL, ALL, NHL и SLL и наличием либо а) высокого количества периферических NK-клеток, либо 2) исходным уровнем экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющим по меньшей мере 60000 ABC, более вероятно получают пользу от лечения с использованием MOR00208.

Как 1) исходные количества периферических NK-клеток, так и 2) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках показали явные корреляции с ответами пациентов на терапию с использованием MOR00208. В частности, у пациентов с исходным количеством периферических NK-клеток, составляющим по меньшей мере 50 клеток/мкл, наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR). DCR включает пациентов, характеризующихся полным ответом (CR) + частичным ответом (PR) + стабильным заболеванием (SD). Кроме того, у пациентов с исходным количеством NK-клеток, составляющим по меньшей мере 50 клеток/мкл, наблюдали значительно лучшую выживаемость без прогрессирования (PFS) по сравнению с пациентами с более низкими количествами NK-клеток. В дополнение, у пациентов с исходным уровнем экспрессии CD16 на NK-клетках, составляющим по меньшей мере 60000 (ABC), наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR).

Таким образом, пациенты с диагнозом CLL, ALL, NHL и SLL и наличием либо а) исходного количества периферических NK-клеток, составляющего по меньшей мере 50 клеток/мкл, либо 2) исходного уровня экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющего по меньшей мере 60000 ABC, более вероятно получают пользу от лечения с использованием MOR00208.

Как 1) исходные количества периферических NK-клеток, так и 2) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках показали явные корреляции с ответами пациентов на терапию с использованием MOR00208. В частности, у пациентов с исходным количеством периферических NK-клеток, составляющим по меньшей мере 100 клеток/мкл, наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR). DCR включает пациентов, характеризующихся полным ответом (CR) + частичным ответом (PR) + стабильным заболеванием (SD). Кроме того, у пациентов с исходным количеством NK-клеток, составляющим по меньшей мере 100 клеток/мкл, наблюдали значительно лучшую выживаемость без прогрессирования (PFS) по сравнению с пациентами с более низкими количествами NK-клеток. В дополнение, у пациентов с исходным уровнем экспрессии CD16 на NK-клетках, составляющим по меньшей мере 60000 (ABC), наблюдали корреляцию с более высокой частотой контроля заболевания (DCR).

Таким образом, пациенты с диагнозом CLL, ALL, NHL и SLL и наличием либо а) исходного количества периферических NK-клеток, составляющего по меньшей мере 100 клеток/мкл, либо 2) исходного уровня экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющего по меньшей мере 60000 ABC, более вероятно получают пользу от лечения с использованием MOR00208.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показаны аминокислотные последовательности переменных доменов и CDR MOR00208.

На фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности полных тяжелой и легкой цепей MOR00208.

На фиг. 3 показан анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) количеств периферических NK-клеток в качестве прогностического параметра для DCR.

На фиг. 4 показан ROC-анализ уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках (ABC) в качестве прогностического параметра для DCR.

На фиг. 5 показан ROC-анализ количества периферических T-клеток в качестве прогностического параметра для DCR.

На фиг. 6 показано, что количества периферических NK-клеток и уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках являются независимыми переменными и не коррелируют.

На фиг. 7 показана диаграмма Фореста в отношении DCR в подгруппах пациентов с конкретными исходными характеристиками и биомаркерами.

На фиг. 8 показана разница в выживаемости без прогрессирования между пациентами с количествами, составляющими по меньшей мере 100 клеток/мкл периферических NK-клеток, по сравнению с пациентами с более низкими количествами NK-клеток.

На фиг. 9 показана разница в выживаемости без прогрессирования между пациентами, характеризующимися по меньшей мере 60000 ABC при экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, по сравнению с пациентами с более низким уровнем экспрессии CD16 на NK-клетках.

На фиг. 10 показана разница в выживаемости без прогрессирования между пациентами с количествами, составляющими по меньшей мере 500 клеток/мкл периферических T-клеток, по сравнению с пациентами с более низкими количествами T-клеток.

Подробное описание изобретения

Термин "антитело" означает моноклональные антитела, в том числе любой изотип, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Антитело IgG состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, которые соединены дисульфидными связями. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и переменную область. Каждая переменная область содержит три сегмента, называемых "определяющими комплементарность областями" ("CDR") или "гипервариабельными областями", которые в первую очередь отвечают за связывание эпитопа антигена. Они обозначены как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно от N-конца. Более высоко консервативные части переменных областей вне CDR называются "каркасными областями". Термин "фрагмент антитела" означает фрагмент Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другой фрагмент, который содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи, при этом каждая содержит CDR и каркасные области.

"VH" относится к переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина антитела или фрагмента антитела. "VL" относится к переменной области легкой цепи иммуноглобулина антитела или фрагмента антитела.

"Fc-область" означает константную область антитела, которая у людей может быть из подкласса IgG1, 2, 3, 4 или других подклассов. Последовательности Fc-областей человека доступны на IMGT, Human IGH C-REGIONS, www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/HuIGHCallgenes.html (взяты 16 мая 2011 г.).

Термин "пациент" включает в себя человека.

NHL представляет собой неоднородное злокачественное новообразование, происходящее из лимфоцитов. В США частота возникновения заболевания оценивается на уровне 65000/год, при этом смертность составляет примерно 20000 (Американское онкологическое общество, 2006 г.; и обзор SEER статистических данных по раку). Заболевание может возникать во всех возрастных группах, обычно начало

наблюдается у взрослых старше 40 лет с увеличением частоты возникновения заболевания с возрастом. NHL характеризуется клональной пролиферацией лимфоцитов, которые накапливаются в лимфатических узлах, крови, костном мозге и селезенке, хотя может быть вовлечен любой крупный орган. Существующая система классификации, используемая патоморфологами и клиницистами, представляет собой классификацию опухолей согласно Всемирной организации здравоохранения (WHO), которая группирует NHL по новообразованиям из предшественников и зрелых В-клеток и Т-клеток. PDQ в настоящее время отделяет NHL как индолентную или агрессивную для включения в клинические испытания. Группа индолентной NHL состоит в основном из фолликулярных подтипов, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, MALT (лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек) и лимфомы маргинальной зоны; индолентная включает примерно 50% пациентов с вновь диагностированной В-клеточной NHL. Агрессивная NHL включает пациентов с диагностированными на гистологическом уровне преимущественно диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBL, DLBCL или DLCL) (40% всех вновь диагностированных пациентов характеризуются диффузными крупными клетками), лимфомы Беркитта и лимфомы из клеток мантической ткани. Клиническое течение NHL чрезвычайно изменчиво. Основной детерминантой клинического течения является гистологический подтип. Наиболее индолентные типы NHL рассматриваются как неизлечимое заболевание. Пациенты первоначально отвечают либо на химиотерапию, либо на терапию антителами, и у большинства из них будет рецидив. Исследования, проведенные до настоящего времени, не продемонстрировали улучшения выживаемости при раннем вмешательстве. У бессимптомных пациентов приемлемо "наблюдать и ждать" до тех пор, пока у пациента не проявятся симптомы или темп заболевания не окажется ускоряющимся. Со временем заболевание может трансформироваться в более агрессивную гистологическую форму. Медиана выживаемости составляет от 8 до 10 лет, и пациенты с индолентной формой часто получают 3 или более вида лечения во время фазы лечения их заболевания. Первоначальное лечение пациента с симптомами индолентной NHL исторически представляло собой комбинированную химиотерапию. Наиболее часто используемые средства включают циклофосфамид, винкристин и преднизон (СVP); или циклофосфамид, адриамицин, винкристин, преднизон (СНОР). Примерно от 70 до 80% пациентов будут отвечать на начальную химиотерапию, продолжительность ремиссий длится порядка 2-3 лет. В конечном итоге у большинства пациентов развивается рецидив. Открытие и клиническое применение антитела к CD20, ритуксимаба, обеспечило значительное улучшение значения частоты ответа и выживаемости. Современным стандартом лечения большинства пациентов является ритуксимаб + СНОР (R-СНОР) или ритуксимаб + СVP (R-СVP). Интерферон одобрен для первоначального лечения NHL в комбинации с алкилирующими средствами, но имеет ограниченное применение в США. Терапия ритуксимабом оказалась эффективной при нескольких типах NHL и в настоящее время одобрена в качестве лечения первой линии как для индолентной (фолликулярной лимфомы), так и для агрессивной NHL (диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы). Тем не менее, существуют значительные ограничения моноклонального антитела (mAb) к CD20, включая первичную резистентность (50% ответ у рецидивирующих пациентов с индолентной формой), приобретенную резистентность (50% частота ответа при повторном лечении), редкий полный ответ (2% частота полного ответа рецидивирующей популяции), а также длительный характер рецидива. Наконец, многие В-клетки не экспрессируют CD20, и поэтому многие нарушения с участием В-клеток не поддаются лечению с применением терапии антителами к CD20.

В дополнение к NHL существует несколько типов лейкозов, которые являются результатом дисрегуляции функции В-клеток. Хронический лимфоцитарный лейкоз (также известный как "хронический лимфоидный лейкоз" или "CLL") представляет собой тип лейкоза взрослых, вызванный аномальным накоплением В-лимфоцитов. При CLL злокачественные лимфоциты могут выглядеть нормальными и зрелыми, но они не способны эффективно справляться с инфекцией. CLL является наиболее распространенной формой лейкоза у взрослых. У мужчин вероятность развития CLL в два раза выше, чем у женщин. Однако ключевым фактором риска является возраст. Свыше 75% новых случаев диагностируется у пациентов старше 50 лет. Ежегодно диагностируют более 10000 случаев, а смертность составляет почти 5000 в год (Американское онкологическое общество, 2006 г., и обзор SEER статистических данных по раку). CLL является неизлечимым заболеванием, но в большинстве случаев прогрессирует медленно.

Многие люди с CLL ведут нормальную и активную жизнь в течение многих лет. Из-за медленного начала CLL на ранней стадии, как правило, не лечится, поскольку считается, что раннее вмешательство при CLL не улучшает время выживания или качество жизни. Вместо этого состояние контролируют с течением времени. Первоначальные виды лечения CLL варьируют в зависимости от точного диагноза и прогрессировать заболевания. Существуют десятки средств, используемых для терапии CLL. Комбинированные схемы химиотерапии, такие как FCR (флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб) и BR (ибрутиниб и ритуксимаб), эффективны как при недавно диагностированном CLL, так и при его рецидиве. Аллогенную трансплантацию костного мозга (стволовых клеток) редко используют в качестве лечения первой линии для CLL из-за ее риска.

Другим типом лейкоза является мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL), которая рассматривается как вариант CLL без клонального лимфоцитоза, необходимого для диагностики CLL, но в остальном имеющей общие патологические и иммунофенотипические признаки (Campo et al., 2011). Опре-

деление SLL требует наличия лимфаденопатии и/или спленомегалии. Более того, количество В-лимфоцитов в периферической крови не должно превышать $5 \times 10^9/\text{л}$. При SLL диагноз должен подтверждаться гистопатологической оценкой биопсии лимфатических узлов, когда это возможно (Hallek et al., 2008). Коэффициент заболеваемости SLL составляет примерно 25% от CLL в США (Dores et al., 2007).

Другим типом лейкоза является острый лимфобластный лейкоз (ALL), также известный как острый лимфоцитарный лейкоз. ALL характеризуется избыточной продукцией и непрерывным размножением злокачественных и незрелых белых клеток крови (также известных как лимфобласты) в костном мозге. "Острый" обозначает недифференцированное, незрелое состояние циркулирующих лимфоцитов ("бластов") и то, что болезнь прогрессирует быстро с ожидаемой продолжительностью жизни от нескольких недель до нескольких месяцев при отсутствии лечения. ALL наиболее часто встречается в детском возрасте с пиком заболеваемости в 4-5 лет. Дети в возрасте от 12 до 16 лет легче погибают от него, чем другие. В настоящее время по меньшей мере 80% случаев ALL в детском возрасте считают излечимыми. Ежегодно диагностируется около 4000 случаев, а смертность составляет почти 1500 в год (Американское онкологическое общество, 2006 г., и обзор SEER статистических данных по раку).

Применение антитела к CD19 при неспепидических В-клеточных лимфомах обсуждается в WO 2007076950 (US 2007154473), оба из которых включены посредством ссылки. Применение антитела к CD19 при CLL, NHL и ALL описано в Scheuermann et al., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995), которая включена посредством ссылки в полном объеме.

Дополнительные антитела, специфичные в отношении CD19, описаны в

WO2005012493 (US7109304), WO2010053716 (US12/266999) (Immunomedics); WO2007002223 (US8097703) (Medarex); WO2008022152 (12/377251) и WO2008150494 (Xencor), WO2008031056 (US11/852106) (Medimmune); WO 2007076950 (US 11/648505) (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (US12/253895) (Seattle Genetics) и WO2010095031 (12/710442) (Glenmark Pharmaceuticals), WO2012010562 и WO2012010561 (International Drug Development), WO2011147834 (Roche Glycart) и WO2012/156455 (Sanofi),

все из которых включены посредством ссылки в полном объеме.

Термин "CD19" относится к белку, известному как CD19, имеющему следующие синонимы: B4, антиген CD19 В-лимфоцитов, поверхностный антиген B4 В-лимфоцитов, CVID3, антиген CD19 дифференцировки, MGC12802 и поверхностный антиген Leu-12 Т-клеток.

CD19 человека имеет аминокислотную последовательность

```
MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLT
WSRESPLKPKLKSGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQPGPPSEKA
WQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW
AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSQDLTMAPGSTLWLSVCGVPPDSVSRGPLSW
THVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL
TMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLR
RKRKRMTDPTRRRFFKVTPPPVGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGT
APSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPVEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLQ
DQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARMTDFLSPHGS
AWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADS YENMDNPD
GPDPAWGGGGRMGTWSTR (SEQ ID NO: 7).
```

"MOR00208" представляет собой антитело к CD19. Аминокислотная последовательность вариабельных доменов представлена на фиг. 1. Аминокислотная последовательность Fc-областей тяжелой и легкой цепей MOR00208 представлена на фиг. 2. "MOR00208" и "XmAb 5574" используются как синонимы для описания антитела, показанного на фиг. 1 и 2. Антитело MOR00208 описано в заявке на выдачу патента США с серийным номером 12/377251, которая включена посредством ссылки в полном объеме.

В заявке на выдачу патента США с серийным номером 12/377251 описано антитело под названием 4G7 H1.52 гибрид S239D/I332E/4G7 L1.155 (позднее названное MOR00208) следующим образом:

>4G7 H1.52 гибрид S239D/I332E

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPNYNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYY
GTRVFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

> 4G7 L1.155

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQ
LLIYRMSNLNSGVPRDFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTYSLSST LTLISK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

Фармацевтическая композиция включает активное средство, например антитело для терапевтического применения у людей. Фармацевтическая композиция дополнительно может включать фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

"Введенный" или "введение" относится к доставке фармацевтической композиции с помощью инъекционной формы, при помощи такого как, например, внутривенный, внутримышечный, внутрикожный или подкожный путь доставки или путь доставки через слизистые, например в виде назального спрея или аэрозоля для ингаляции или в виде проглатываемых раствора, капсулы или таблетки.

Антитело, вводимое согласно настоящему изобретению, вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для обеспечения некоторого улучшения клинических проявлений данного заболевания или расстройств. Например, пациенты в приведенном в качестве примера исследовании получали дозу MOR00208 в количестве 12 мг/кг один раз в неделю, а для поддержания - раз в две недели или ежемесячно.

Количество, которое эффективно для конкретной терапевтической цели, будет зависеть от тяжести заболевания или поражения, а также от веса и общего состояния субъекта. Будет понятно, что определение подходящей дозы может быть выполнено путем проведения общепринятых экспериментов, путем построения матрицы значений и проверки разных точек в матрице, причем все это находится в пределах обычных навыков подготовленного терапевта или исследователя в области клинической медицины.

Исходный уровень означает уровень до введения необходимой терапии. Например, до введения необходимого антитела к CD19.

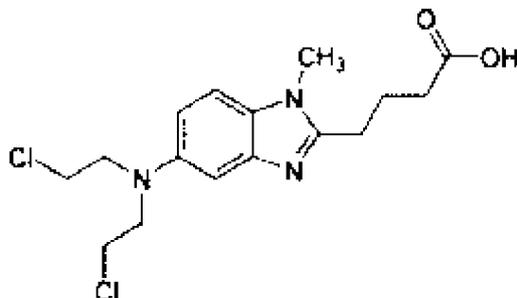
Анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) использовали для анализа прогнозируемости, чувствительности, специфичности и для определения пределов отсека для потенциальных биомаркеров, таких как количества NK-клеток, уровни экспрессии CD16 на NK-клетках и количества Т-клеток. Существуют следующие дополнительные способы оценки оптимального предела отсека: "Max.Accuracy" - предел отсека, который максимально увеличивает точность; b) "Max.DOR" - предел отсека, который максимально увеличивает диагностическое отношение шансов; c) "Error.rate" - предел отсека, который сводит к минимуму частоту ошибок; d) "Max.Accuracy.area" - предел отсека, который максимально увеличивает площадь точности; e) "Max.Sens+Spec" - предел отсека, который максимально увеличивает сумму чувствительности и специфичности; f) "Max.Youden" - предел отсека, который максимально увеличивает индекс Юдена; g) "Se=Sp" - предел отсека, при котором чувствительность равна специфичности; h) "Min.ROC.Dist" - предел отсека, который сводит к минимуму расстояние между кривой и верхним левым углом графика; i) "Max.Efficiency" - предел отсека, который максимально увеличивает эффективность; и j) "Min.MCT" - предел отсека, который сводит к минимуму значение стоимости ошибочной классификации. См. Lopez-Raton, M., Rodriguez-Alvarez, M.X, Cadarso-Suarez, C. and Gude-Sampedro, F. (2014). Optimal Outpoints: An R Package for Selecting Optimal Outpoints in Diagnostic Tests. Journal of Statistical Software 61 (8), 1-36.

Антитела, специфичные к CD19, также протестировали доклинически в комбинации с другими лекарственными средствами. Например, MOR00208 тестировали в комбинации с хлорметинами, аналогами пурина, аналогами талидомида, ингибитором фосфоинозитид-3-киназы, ингибиторами BCL-2 и ингибиторами тирозинкиназы Брутона (BTK).

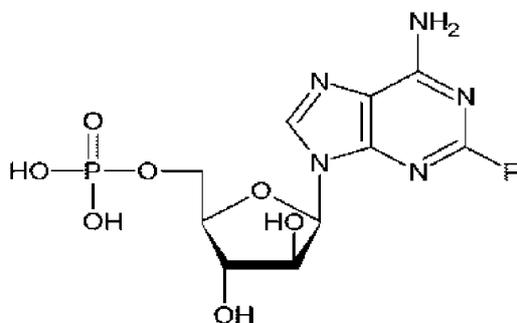
"Хлорметин" представляет собой неспецифическое средство для алкилирования ДНК, используемое

в качестве химиотерапии. Алкилирующие средства добавляют алкильную группу (C_nH_{2n+1}) к основаниям нуклеиновой кислоты, например добавляют алкильную группу к гуаниновому основанию ДНК у 7-го атома азота имидазольного кольца. Стадии алкилирования приводят к образованию межцепочечных поперечных швов (ICL). Эти ICL чрезвычайно цитотоксичны, поскольку блокируют основные метаболические процессы, такие как репликация и транскрипция. К хлорметинам относятся циклофосфамид, хлорамбуцил, урамустин, ифосфамид, мелфалан и бендамустин.

Бендамустин продается под названиями Ribomustin® и Treanda®, а также известен как SDX-105 от Mundipharma International Corporation Limited (лицензиат Astellas Pharma GmbH) и Cephalon, для лечения хронических лимфоцитарных лейкозов (CLL), индолентной В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL) и других лимфом. Бендамустин имеет следующую структуру:



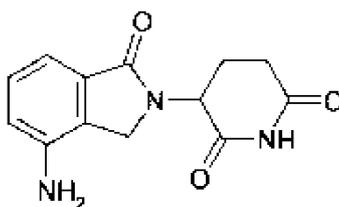
Аналог пурина представляет собой антиметаболит, который имитирует структуру метаболических пуринов, тем самым препятствуя синтезу нуклеиновых кислот. Флударабин, например, можно включить в РНК и ДНК путем замены пуриновых нуклеотидов аденина и гуанина. Аналоги пурина ингибируют рост быстро пролиферирующих клеток индивидуума, например раковых клеток, клеток костного мозга или клеток, присутствующих в желудочно-кишечном тракте. К аналогам пурина относятся меркаптопурин, азатиоприн, тиогуанин и флударабин. Флударабин или флударабина фосфат (Fludara®) представляет собой химиотерапевтическое лекарственное средство, используемое для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза и индолентных неходжкинских лимфом. Флударабин представляет собой аналог пурина. Флударабин ингибирует синтез ДНК, препятствуя рибонуклеотидредуктазе и ДНК-полимеразе, и является специфичным для S-фазы (поскольку эти ферменты высокоактивны во время репликации ДНК). Флударабин имеет следующую структуру:



"Аналог талидомида" включает без ограничения сам талидомид, леналидомид (CC-5013, Ftevlimid™), помалидомид (CC4047, Actimid™) и соединения, раскрытые в WO 2002068414 и WO 2005016326, которые включены посредством ссылки в полном объеме. Термин относится к синтетическому химическому соединению с использованием структуры талидомида в качестве остова (например, добавлены боковые группы или такие группы удалены из исходной структуры). Аналог отличается по структуре от талидомида и его соединений-метаболитов, например разницей в длине алкильной цепи, молекулярным фрагментом, одной или несколькими функциональными группами или изменением ионизации. Термин "аналог талидомида" также включает метаболиты талидомида. К аналогам талидомида относится рацемическая смесь S-и R-энантиомера соответствующего соединения и S-энантиомер или R-энантиомер в отдельности. Рацемическая смесь является предпочтительной.

К аналогам талидомида относятся соединения следующих структур.

(А) Леналидомид.

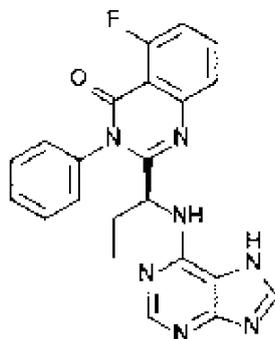


"Ингибитор фосфоинозитид-3-киназы" представляет собой класс медицинских лекарственных средств, функционирующих путем ингибирования одного или нескольких ферментов фосфоинозитид-3-киназ, которые являются частью пути PI3K/AKT/mTOR, важного сигнального пути для многих клеточных функций, таких как контроль роста, метаболизм и инициация трансляции.

Существует несколько различных классов и изоформ PI3K. PI3K класса 1 имеют каталитическую субъединицу, известную как p110, четырех типов (изоформ) - p110 альфа, p110 бета, p110 гамма и p110 дельта. Изучаемые в настоящее время ингибиторы ингибируют одну или несколько изоформ PI3K класса I.

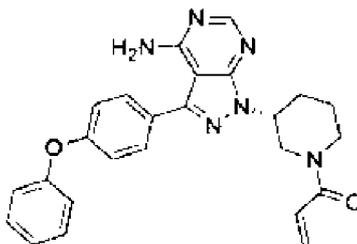
К ингибиторам фосфоинозитид-3-киназы относятся, по меньшей мере, иделалисиб, дувелисиб и копанлисиб. Иделалисиб продается компанией Gilead Sciences, Inc. (торговое название Зиделиг, также называемый GS-1101 или CAL-101). Иделалисиб в настоящее время отмечен для лечения рецидивирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) в комбинации с ритуксимабом у пациентов, для которых только один ритуксимаб будет считаться подходящей терапией из-за других сопутствующих осложнений; рецидивирующей фолликулярной В-клеточной неходжкинской лимфомы (FL) у пациентов, получивших по меньшей мере две предшествующие системные терапии; рецидивирующей мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL) у пациентов, получивших по меньшей мере две предшествующие системные терапии. Данное вещество действует как ингибитор фосфоинозитид-3-киназы; более конкретно, оно блокирует P110δ, дельта-изоформу фермента фосфоинозитид-3-киназы.

Формула иделалисиба представляет собой:

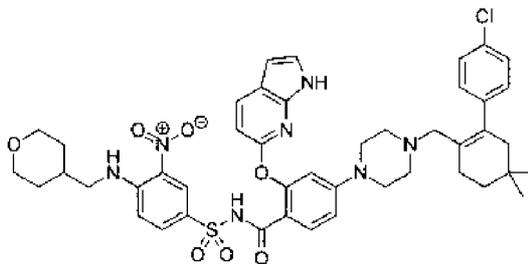


"Ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК)" представляет собой класс лекарственных средств, которые функционируют путем ингибирования фермента тирозин-протеинкиназы ВТК, который играет важную роль в развитии В-клеток. В частности, ВТК содержит домен РН, который связывает фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (PIP3). Связывание PIP3 индуцирует Btk к фосфорилированию фосфолипазы С, которая, в свою очередь, гидролизует PIP2, фосфатидилинозитол, на два вторичных мессенджера, инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерол (DAG), которые затем продолжают модулировать активность нижерасположенных белков во время передачи сигналов В-клеток.

К ингибиторам тирозинкиназы Брутона (ВТК) относится ибрутиниб. Ибрутиниб продается компанией Pharmacyclics, Inc. и Johnson & Johnson's Janssen Pharmaceutical (торговое название Имбрувика, также называемый PCI-32765). Ибрутиниб в настоящее время отмечен для лечения пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL), которые получили по меньшей мере одну предшествующую терапию, с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), которые получили по меньшей мере одну предшествующую терапию, с хроническим лимфоцитарным лейкозом с делецией 17p и с макроглобулинемией Вальденстрема. Формула ибрутиниба представляет собой 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]-1-пиперидинил]-2-пропен-1-он и имеет следующую структуру:



"Ингибитор BCL-2" представляет собой класс лекарственных средств, которые функционируют путем ингибирования антиапоптотического белка В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2), что приводит к запрограммированной гибели клеток. К ингибиторам BCL-2 относится венетоклак. Венетоклак продается компаниями Abbvie и Genentech (торговое название VENCLEXTA™, также известный как GDC-0199, ABT-199 и RG7601). Венетоклак в настоящее время отмечен для лечения пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) с делецией 17p, как обнаружено с помощью одобренного FDA теста, которые получили по меньшей мере одну предшествующую терапию. Формула венетоклакса представляет собой 4-(4-[[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-1-циклогексен-1-ил]метил]-1-пиперазинил)-N-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2H-пиран-4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид и имеет следующую структуру:



"Венетоклак", "ABT" и "ABT-199" используются в данном документе в качестве синонимов.

Варианты осуществления

Одним аспектом является способ идентификации субъекта, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелко-клеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), который отвечает на лечение антителом к CD19, при этом указанный способ включает

- a) взятие образца, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19,
- b) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из
 - i) количества периферических NK-клеток и
 - ii) уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках,
- c) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсечения, где уровни указанного по меньшей мере одного биомаркера, соответствующие заданному уровню отсечения или превышающие его, указывают на субъекта, который получит пользу от лечения антителом к CD19.

В вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. В вариантах осуществления указанный образец содержит периферические NK-клетки.

В вариантах осуществления заданный уровень отсечения указанного биомаркера представляет собой такое исходное количество периферических NK-клеток, как по меньшей мере 50 клеток/мкл, по меньшей мере 75 клеток/мкл, по меньшей мере 100 клеток/мкл, по меньшей мере 125 клеток/мкл, по меньшей мере 150 клеток/мкл, по меньшей мере 175 клеток/мкл, по меньшей мере 200 клеток/мкл, по меньшей мере 225 клеток/мкл или по меньшей мере 250 клеток/мкл. В вариантах осуществления заданный уровень отсечения указанного биомаркера представляет собой такие исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках как по меньшей мере 45000 ABC, по меньшей мере 60000 ABC, по меньшей мере 75000 ABC или по меньшей мере 90000 ABC.

В вариантах осуществления заданный предел отсечения указанного биомаркера представляет собой следующее:

- a) исходное количество периферических NK-клеток, составляющее по меньшей мере 50 клеток/мкл, или
- b) исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющие по меньшей мере 60000 (ABC).

В вариантах осуществления заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой следующее:

мере 60000 (ABC).

В вариантах осуществления заданный уровень отсеечения представляет собой исходное количество периферических NK-клеток, составляющее по меньшей мере 100 клеток/мкл. В вариантах осуществления заданное отсеечение указанного биомаркера представляет собой исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющие по меньшей мере 60000 (ABC).

Одним аспектом является способ идентификации субъекта, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелко-клеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), который отвечает на лечение антителом к CD19, при этом указанный способ включает

а) взятие образца крови, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19,

б) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из

i) количества периферических NK-клеток и

ii) уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках,

с) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсеечения,

где исходное количество периферических NK-клеток составляет по меньшей мере 50 клеток/мкл, по меньшей мере 60 клеток/мкл, по меньшей мере 70 клеток/мкл, по меньшей мере 80 клеток/мкл, по меньшей мере 90 клеток/мкл или по меньшей мере 100 клеток/мкл, и исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках составляют по меньшей мере 60000 (ABC), и где антитело к CD19 содержит

область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),

область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),

область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),

область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),

область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и

область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Одним аспектом является способ идентификации субъекта, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелко-клеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), который отвечает на лечение антителом к CD19, при этом указанный способ включает

а) взятие образца крови, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19,

б) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из

i) количества периферических NK-клеток и

ii) уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках,

с) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсеечения,

где исходное количество периферических NK-клеток составляет по меньшей мере 100 клеток/мкл, или исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках составляют по меньшей мере 60000 (ABC), и где антитело к CD19 содержит

область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),

область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),

область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),

область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),

область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и

область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В вариантах осуществления заданное отсеечение указанного биомаркера представляет собой следующее:

а) исходное количество периферических NK-клеток, составляющее по меньшей мере 100 клеток/мкл, и

б) исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющие по меньшей мере 60000 (ABC).

В вариантах осуществления заданный уровень отсеечения указанного биомаркера представляет собой такое исходное количество периферических NK-клеток как по меньшей мере 50 клеток/мкл, по меньшей мере 75 клеток/мкл, по меньшей мере 100 клеток/мкл, по меньшей мере 125 клеток/мкл, по меньшей мере 150 клеток/мкл, по меньшей мере 175 клеток/мкл, по меньшей мере 200 клеток/мкл, по меньшей мере 225 клеток/мкл или по меньшей мере 250 клеток/мкл. В вариантах осуществления заданный уровень отсеечения указанного биомаркера представляет собой такие исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках как по меньшей мере 45000 ABC, по меньшей мере 60000 ABC, по меньшей мере 75000 ABC или по меньшей мере 90000 ABC.

Одним аспектом является способ лечения пациента, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелко-клеточную

а) взятие образца, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19,
 б) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из

- i) количества периферических NK-клеток и
- ii) уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках,
- с) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсечения,
- д) введение эффективного количества антитела к CD19 пациенту с количеством периферических NK-клеток, составляющим по меньшей мере 100 клеток/мкл, или уровнем экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющим по меньшей мере 60000 (ABC).

Одним аспектом является способ лечения пациента, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), включающий введение эффективного количества антитела к CD19 пациенту, если

- а) исходное количество периферических NK-клеток пациента составляет по меньшей мере 100 клеток/мкл, или
- б) исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках составляют по меньшей мере 60000 (ABC).

Одним аспектом является способ лечения пациента, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), включающий

- а) получение количества периферических NK-клеток у пациента,
- б) введение эффективного количества антитела к CD19 пациентам с количествами периферических NK-клеток, составляющими по меньшей мере 100 клеток/мкл.

Одним аспектом является способ лечения пациента, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), включающий

- а) получение уровней экспрессии CD16 на периферических NK-клетках пациента,
- б) введение эффективного количества антитела к CD19 пациентам с уровнями экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющими по меньшей мере 60000 (ABC).

В вариантах осуществления антитело к CD19 вводят пациентам, имеющим как исходное количество периферических NK-клеток, составляющее по меньшей мере 100 клеток/мкл, так и исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющий по меньшей мере 60000 (ABC). В вариантах осуществления антитело к CD19 вводят пациентам с исходным количеством периферических NK-клеток, составляющим по меньшей мере 50 клеток/мкл, по меньшей мере 75 клеток/мкл, по меньшей мере 100 клеток/мкл, по меньшей мере 125 клеток/мкл, по меньшей мере 150 клеток/мкл, по меньшей мере 175 клеток/мкл, по меньшей мере 200 клеток/мкл, по меньшей мере 225 клеток/мкл или по меньшей мере 250 клеток/мкл. В вариантах осуществления антитело к CD19 вводят пациентам с исходными уровнями экспрессии CD16 на периферических NK-клетках, составляющими по меньшей мере 45000 ABC, по меньшей мере 60000 ABC, по меньшей мере 75000 ABC или по меньшей мере 90000 ABC.

В вариантах осуществления исходное количество периферических NK-клеток или исходные уровни CD16 (ABC) на периферических NK-клетках получают из образца крови, взятого у пациента. В вариантах осуществления количество периферических NK-клеток и/или уровни экспрессии CD16 измеряют до введения антитела к CD19.

- В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),
- область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),
- область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),
- область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),
- область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и
- область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В вариантах осуществления исходное количество периферических NK-клеток или исходные уровни экспрессии CD16 на периферических NK-клетках получают из образца крови, взятого у пациента.

В одном варианте осуществления у пациента имеется неходжкинская лимфома. В вариантах осуществления неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и лимфомы из клеток мантийной зоны. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой фолликулярную лимфому. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома является индолентной неходжкинской лимфомой. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек. В одном вари-

анте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой лимфому маргинальной зоны. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой лимфому Беркитта. В одном варианте осуществления неходжкинская лимфома представляет собой лимфому из клеток мантической зоны. В одном варианте осуществления у пациента имеется хронический лимфоцитарный лейкоз. В одном варианте осуществления у пациента имеется острый лимфобластный лейкоз. В одном варианте осуществления у пациента имеется мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL).

В вариантах осуществления лечение приводит к терапевтическому эффекту, выбранному из группы, состоящей из частоты контроля заболевания (DCR) и более длительной выживаемости без прогрессирования.

В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества хлорметина. В одном варианте осуществления хлорметин представляет собой бендамустин. В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества аналога пурина. В вариантах осуществления аналог пурина представляет собой флударабин. В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества ингибитора тирозинкиназы Брутона (BTK). В вариантах осуществления ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTK) представляет собой ибрутиниб. В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества ингибитора фосфоинозитид-3-киназы. В одном варианте осуществления ингибитор фосфоинозитид-3-киназы представляет собой иделалисиб. В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества аналога талидомида. В одном варианте осуществления аналог талидомида представляет собой леналидомид. В вариантах осуществления лечение дополнительно включает введение эффективного количества ингибитора BCL-2. В одном варианте осуществления ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс.

Поскольку проиллюстрированное антитело к CD19 и другие антитела к CD19 связывают CD19, полагают, что аналогичные результаты можно увидеть с другими антителами к CD19. Другие антитела к CD19 описаны в заявке на выдачу патента США с серийным номером 12/377251 (Xencor), WO 2005012493, WO 2010053716 (Immunomedics); WO 2007002223 (Medarex); WO 2008022152 (Xencor); WO 2008031056 (Medimmune); WO 2007/076950 (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (Seattle Genetics) и WO 2010095031 (Glenmark Pharmaceuticals), все из которых включены посредством ссылки в полном объеме.

В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, включает антитело, которое конкурирует с антителом, содержащим

область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),
 область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),
 область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),
 область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),
 область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и
 область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, включает антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее

область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),
 область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),
 область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),
 область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),
 область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и
 область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит
 область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1),
 область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2),
 область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3),
 область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4),
 область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и
 область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

В вариантах осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
 Y
 NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVF
 DYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

и варибельный домен легкой цепи с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK
(SEQ ID NO: 11).

В одном варианте осуществления указанное антитело содержит константный домен тяжелой цепи с последовательностью

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDWLNQKEYKCKVSNKALPAAPEEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 12).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит константный домен легкой цепи с последовательностью

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDS KD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 13).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRV
FDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDWLNQKEY
KCKVSNKALPAAPEEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

В одном варианте осуществления антитело, специфичное в отношении CD19, содержит легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
MSNLNGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSSST LTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 9).

Варианты осуществления включают фармацевтическую композицию. В вариантах осуществления композиция содержит приемлемый носитель. В вариантах осуществления композицию вводят в эффективном количестве.

Примеры

Пример 1. Подсчет Т-клеток и NK-клеток.

Объем клинического исследования MOR00208C201 включал оценку нескольких диагностических биомаркеров. В рамках этой инициативы проводили исходный подсчет периферических Т- и NK-клеток в клинических центрах.

Т-клетки представляют собой тип лимфоцитов (подтип белых кровяных клеток), которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Их можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и NK-клетки, по наличию Т-клеточного рецептора на поверхности клетки.

Клетки натуральные киллеры или NK-клетки представляют собой тип цитотоксических лимфоцитов, крайне необходимый для врожденной иммунной системы. NK-клетки обеспечивают быстрые ответы в отношении инфицированных вирусом клеток, действуя приблизительно через 3 дня после инфицирования, и отвечают на формирование опухоли. Как правило, иммунные клетки выявляют главный комплекс гистосовместимости (МНС), презентированный на поверхностях инфицированных клеток, иницируя высвобождение цитокинов, вызывающее лизис или апоптоз. Однако NK-клетки уникальны, поскольку они обладают способностью распознавать стрессированные клетки в отсутствие антител и МНС, что обеспечивает гораздо более быструю иммунную реакцию.

Материалы и способы.

TriTest CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP (с пробирками TruCOUNT), BD Biosciences, номер по каталогу: 340403 (США); 342442 (Европа). Пипетторы и наконечники пипеток, способные доставлять 20 мкл, 50 мкл и 450 мкл, Gilson Inc. Лизирующие растворы FACS, BD Biosciences, номер по каталогу: 349202.

Инструменты: проточный цитометр, вихревая мешалка.

Подготовка к проточной цитометрии.

Цельную кровь окрашивают мечеными флуорохромом антителами (реагенты TriTEST), которые специфически связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов. Клетки проходят в лазерном луче и рассеивают свет лазера. Окрашенные клетки флуоресцируют. Эти сигналы светорассеяния и флуоресценции, выявляемые прибором, предоставляют информацию о размере клетки, сложности внутреннего строения и относительной интенсивности флуоресценции. Реагенты TriTEST используют иницирование флуоресценции, что позволяет прямое гейтирование по флуоресценции популяции лимфоцитов NK-и T-клеток для снижения загрязнения нелизировавшими или имеющими ядро красными кровяными клетками в проточной ячейке.

Окрашивание.

Для каждого образца пациента пробирку TruCOUNT маркировали идентификационным номером образца. 20 мкл реагента TriTEST CD3/CD16+CD56/CD45 помещали с помощью пробирки на дно пробирки. 50 мкл хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом помещали с помощью пипетки на дно пробирки. Кровь с антикоагулянтом (EDTA), хранящуюся при комнатной температуре (20-25°C), необходимо окрасить в течение 24 ч после получения и проанализировать в течение 6 ч после окрашивания (выдерживать при комнатной температуре и защищать от света). Пробирку осторожно встряхивали для смешивания. Пробирку инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре (20-25°C). В пробирку добавляли 450 мкл лизирующего раствора 1X FACS. Пробирку перемешивали и снова инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре (20-25°C).

При помощи пробирок TruCOUNT известный объем образца окрашивают непосредственно в пробирке TruCOUNT. Лиофилизированный осадок в пробирке растворяется, высвобождая известное количество флуоресцентных гранул. Во время анализа абсолютное число (клеток/мкл) положительных клеток в образце можно определить путем сравнения клеточных событий с событиями гранул.

Проточная цитометрия.

Клетки тщательно перемешивали (на низкой скорости), чтобы уменьшить агрегацию, прежде чем прогонять их на проточном цитометре.

Анализ данных.

Визуально осматривали точечный график CD45 в зависимости от SSC. Лимфоциты выглядят как яркая, компактная клеточная популяция с от низкого до среднего SSC. Моноциты (M) и гранулоциты (G) выглядят как отдельные популяции. Анализ завершали, когда клеточные популяции моноцитов и лимфоцитов показывали четкое разделение.

Лимфоциты сначала гейтировали как CD45-положительную популяцию клеток с низким SSC. Предварительно отбирали CD16/CD56, в зависимости от CD3. T-клетки (T) должны выглядеть как компактный яркий CD3-положительный кластер. NK-клетки (NK) должны выглядеть как компактный яркий CD16/CD56-положительный кластер. Гейтирование завершали и подсчитывали T- и NK-клетки.

Подсчет событий гранул выполняли с использованием графика CD16/CD56, в зависимости от CD3, без какого-либо предварительного выбранного гейта. Гранулы должны выглядеть как двойной PE/FITC-положительный кластер.

Расчет абсолютных количеств.

Абсолютное число (клетки/мкл крови) T-клеток или NK-клеток в образце определяли путем сравнения клеточных событий с событиями гранул. Анализ данных проводили либо с использованием программного обеспечения MultiSET, либо вручную (при помощи CellQuest или другого программного обеспечения).

Для ручного подсчета число (№) полученных положительных клеточных событий делили на число (№) полученных событий гранул, затем умножали на общее число гранул TruCOUNT (в зависимости от партии), деленное на объем образца цельной крови, составляющий 50 мкл. Результат представляет собой значения абсолютного числа клеток на микролитр.

Уравнение:

$$\frac{\text{содержащий популяцию клеток (T или NK)}}{\text{содержащий количество гранул}} \times \frac{\text{количество событий в гейте}}{\text{количество событий в гейте}^2} \times \frac{\text{№ всех гранул TruCOUNT}}{50 \text{ мкл цельной крови}} = \text{№ клеток/мкл крови}$$

Пример:

$$\frac{2709 \text{ полученных } T \text{ - клеток}}{10\,000 \text{ полученных гранул}} \times \frac{\text{всего } 51\,667 \text{ гранул в пробирке}}{50 \text{ мкл}} = 280 \text{ } T \text{ - клеток /мкл}$$

Пример 2. Количественная оценка CD16 на NK-клетках.

В рамках клинического исследования MOR00208C201 количественно оценивали CD16 (диагностический биомаркер) на периферических NK-клетках централизованно в Центральных лабораториях ICON (Farmingdale, Нью Йорк).

Материалы и способы.

Антитела.

CD45 AmCyan (клон 2D1, BD Biosciences, номер по каталогу 339192); CD3 FITC (клон UCHT1, BioLegend, номер по каталогу 300406); мышиный IgG FITC (клон MOPC-21, BioLegend, номер по каталогу 400110); CD16 PE (клон 3G8, BioLegend, номер по каталогу 302008); MOR00208; мышиный IgG PE (клон MOPC-21, BioLegend, номер по каталогу 400114); CD56 PerCP-Cy5.5 (клон HCD56, BioLegend, номер по каталогу 318322) и мышиный IgG PerCP-Cy5.5 (клон MOPC-21, BioLegend, номер по каталогу 400150).

Материал.

Защитная транспортная тара PharmaTherm (Intelsius, номер по каталогу PHT014); пробирки для получения мононуклеарных клеток с гепарином натрия BD Vacutainer® CPT™ (16×125 мм/8 мл) (BD, номер по каталогу 362753); круглодонные пробирки BD Falcon™ 12×75 мм (BD, номер по каталогу 352052); гранулы CS&T (BD Biosciences номер по каталогу 642212); фетальная бычья сыворотка (FBS), инактивированная нагреванием (Sigma F4135 или эквивалент); PBS Дульбекко без Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺ (Gibco, номер по каталогу 14190, или эквивалент); BD Falcon, фильтр с размером пор 100 мкм для клеток, желтый (BD Bioscience, номер по каталогу 352360); буфер FACS, 3% инактивированной нагреванием FBS в 1X DPBS; деионизированная вода, лабораторный материал; измельченный (мокрый) лед; емкость для льда; алюминиевая фольга; конические пробирки, 50 мл; конические пробирки, 15 мл; стерильные наконечники с фильтром для пипетки; лизирующий буфер BD Pharm Lyse (BD Biosciences, номер по каталогу 555899); набор для окрашивания мертвых клеток ViViD LIVE/DEAD® Fixable Violet Dead Cell Stain, для длины волны возбуждения 405 нм (Life Technologies, номер по каталогу L34955); гранулы ArC Amine Reactive Beads (Life Technologies, номер по каталогу A10346); гранулы BD QuantiBRITE (BD Biosciences, номер по каталогу 340495) и нейлоновое сито 52 мкм (Miami Aqua Culture, для кат.: нейлон 52 мкм, 32% живого сечения, вплетенного в материал).

Оборудование.

Центрифуга (с возможностью охлаждения); лабораторный встряхиватель (встряхиватель-качалка для пробирок); вихревой смеситель; ламинарный вытяжной шкаф; инкубатор (устанавливается на 37°C, 5% CO₂); Advia (счетчик клеток); проточный питомер BD FACSCANTO II; контейнер Desi-Vac™, 1,5 л (VWR, номер по каталогу 62344-930); Humidity Sponge™ с индикатором (VWR, номер по каталогу 61161-319) и устройство для отслеживания значения влажности с памятью Traceable Humidity-On-A-Card (VWR, номер по каталогу 15551-012).

Таблица 1. Набор реагентов для количественной оценки CD16 в отношении РВМС (мононуклеарной клетки периферической крови)

Описание	№ пробирки	V450	AmCyan	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
Контрольная пробирка 1	1	ViViD	CD45	Ms IgG	Ms IgG	Ms IgG	---
CD16 ABC	2	ViViD	CD45	CD3	CD16	CD56	---

Процедуры получения и введения метки в РВМС.

Периферическую кровь пациента собирали в пробирки CPT и отправляли в течение ночи из клинических центров в центральную лабораторию в защитной транспортной таре. Пробирки CPT центрифугировали в течение 25 мин при 1800 x g при комнатной температуре в положении тормоз включен. После центрифугирования пробирки CPT сразу же ставили вверх дном и помещали на 10 мин на лабораторный встряхиватель, чтобы повторно суспендировать слой РВМС в аутологичной плазме и растворить большинство образовавшихся клеточных агрегатов. В стерильных условиях гомогенизированную суспензию РВМС/плазмы медленно декантировали в центр фильтра с размером пор 100 мкм для клеток, находящегося на стерильной конической пробирке объемом 50 мл. Равный объем 1 X DPBS добавляли к суспензии РВМС/плазмы (примерно 4 мл) в конической пробирке объемом 15 мл. Пробирки центрифугировали при 300 x g в течение 10 мин при 4°C и удаляли надосадочную жидкость. Пробирки перемешивали для ресуспендирования осадка клеток. Осадок клеток промывали с помощью DBPS, центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и ресуспендировали путем перемешивания. Промытую суспензию РВМС добавляли в пробирку Эппендорфа, содержащую 1 мкл исходного раствора ViViD; инкубировали в течение 15 мин на льду и выдерживали в темноте (накрыть алюминиевой фольгой). Окрашенные ViViD РВМС переносили в новую промаркированную коническую пробирку, а затем добавляли ледяной буфер FACS. Клетки центрифугировали и снова перемешивали для ресуспендирования. Пробирки из полистирола фирмы Falcon маркировали для каждого образца (табл. 1). Антитела или контрольные изотипические антитела добавляли в соответствующие пробирки. Аликвоту окрашенных ViViD РВМС добавляли в

каждую пробирку (табл. 1). Пробирки перемешивали и инкубировали. Добавляли буфер FACS и клетки центрифугировали и снова перемешивали для ресуспендирования. Добавляли лизирующий буфер BD Pharm Lyse и клетки перемешивали, центрифугировали и аспирировали для удаления надосадочной жидкости и снова перемешивали для ресуспендирования. Снова добавляли буфер FACS и клетки центрифугировали и снова перемешивали для ресуспендирования. Затем образцы обрабатывали на питометре FACSCanto II и оценивали ABC (количество связанных антител на клетку) по стандартизированной MFI, как описано в Iyer S, et al., Expression of CD69 on activated T cells using R-phycoerythrin labeled beads, Cytometry, 1996; #AC78 (Suppl.8):113 и Iyer S., et al., QuantiBRITE: A New Standard for Fluorescence Quantitation, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. 1997. White Paper.

Пример 3. Испытание NHL.

Исследование Fc-оптимизированного антитела к CD19 (MOR00208) для лечения неходжкинской лимфомы (NHL), идентификатор на ClinicalTrials.gov: NCT01685008, набор прекращен.

Критерии включения были такими, как приведенные ниже.

1. Пациенты мужского или женского пола возрастом ≥ 18 лет.
2. Гистологически подтвержденный диагноз в соответствии с классификацией REAL/WHO следующих В-клеточных лимфом: а) FL, б) MCL, в) DLBCL, д) другие индолентные NHL (например, MZL/MALT).

3. NHL пациентов должна прогрессировать после по меньшей мере 1 предшествующей схемы, предусматривающей ритуксимаб.

4. Один очаг измеряемого заболевания определен с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) или компьютерной томографии (СТ) как по меньшей мере одно поражение, которое имеет размеры по меньшей мере 1,5×1,5 см, за исключением: только для пациентов с MCL, могут зачисляться пациенты с неизмеряемым заболеванием, но с поддающимися оценке очагами (костный мозг, селезенка, периферическая кровь, желудочно-кишечный тракт).

5. Для пациентов, которые ранее получали аутологичную трансплантацию стволовых клеток, должно пройти по меньшей мере 4 недели после трансплантации перед введением исследуемого лекарственного средства, и они должны продемонстрировать полное восстановление на гематологическом уровне.

6. Прерывание предыдущей терапии моноклональными антителами (за исключением ритуксимаба) или введения радиоиммунотерапии по меньшей мере за 60 дней до введения исследуемого лекарственного средства.

7. Прекращение введения ритуксимаба по меньшей мере за 14 дней до скринингового визита и подтверждение того, что либо отсутствует ответ, либо есть прогрессирование заболевания после лечения ритуксимабом.

8. У пациентов с DLBCL была положительная сканограмма [18F]фтордезоксиглюкоза-позитронно-эмиссионной томографии (FDG-PET) в начале исследования (критерии ответа Cheson).

9. Ожидаемая продолжительность жизни > 3 месяцев.

10. Функциональный статус согласно ECOG < 3 .

11. Лабораторные критерии при скрининге: а) абсолютное количество нейтрофилов (ANC) $\geq 1,0$ ($1000/\text{мм}^3$), б) количество тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9/\text{л}$ без предшествующего переливания в течение 10 дней до первого введения исследуемого лекарственного средства, в) гемоглобин $\geq 8,0$ г/дл (может быть перелит), д) креатинин сыворотки $< 2,0$ x верхний предел нормы (ULN), е) общий билирубин $< 2,0 \times \text{ULN}$, ф) аланинтрансаминаза (ALT) и аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 2,5 \times \text{ULN}$.

12. Если женщина детородного возраста, отрицательный тест на беременность должен быть подтвержден до регистрации, и применение двухбарьерной контрацепции, оральное контрацептива плюс барьерного контрацептива, или подтверждение прохождения клинически задокументированной общей гистерэктомии и/или оофорэктомии, перевязки маточных труб.

13. Если мужчина, эффективный барьерный способ контрацепции должен использоваться во время исследования и в течение 3 месяцев после последней дозы, если пациент проявляет половую активность с женщиной детородного возраста.

14. Способность соблюдать требования всех связанных с исследованием процедур, применений лекарственных препаратов и оценок.

15. Способность понять и дать письменное информированное согласие и соблюдать протокол исследования.

Критерии исключения были такими, как описанные ниже.

1. Предшествующее лечение с применением цитотоксической химиотерапии, иммунотерапии, лучевой терапии или другой специфической для лимфомы терапии в течение 14 дней до скринингового визита, или пациент не восстановился от побочных эффектов предшествующей специфической для лимфомы терапии.

2. Лечение системным экспериментальным средством в течение 28 дней перед скрининговым визитом.

3. Предшествующее лечение антителом или фрагментами антитела к CD19.

4. Предшествующая аллогенная трансплантация стволовых клеток.

5. Известная или подозреваемая гиперчувствительность к вспомогательным веществам, содержащимся в составе исследуемого лекарственного средства.

6. Клинически значимые сердечно-сосудистые заболевания или сердечная недостаточность, кардиомиопатия, ранее существовавшая клинически значимая аритмия, острый инфаркт миокарда в течение 3 месяцев после включения в исследование, стенокардия в течение 3 месяцев после включения в исследование.

7. Клинические или лабораторные свидетельства активного гепатита В или гепатита С.

8. История ВИЧ-инфекции.

9. Любая активная системная инфекция (вирусная, грибковая или бактериальная), требующая активной парентеральной терапии антибиотиками в течение 4 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

10. Текущее лечение иммунодепрессантами, отличными от предписанных кортикостероидов (эквивалентно не более 10 мг преднизона).

11. Крупная хирургическая операция или лучевая терапия в течение 4 недель перед первым введением исследуемого лекарственного средства.

12. Системные заболевания (сердечно-сосудистые, почечные, печеночные и т.д.), которые по мнению исследователя препятствовали бы изучению лечения.

13. История или клинические признаки заболевания центральной нервной системы (CNS), менингеального или эпидурального заболевания, включая метастазы в головной мозг.

14. Активное лечение/химиотерапия для другой первичной злокачественности в течение последних 5 лет.

15. Беременность или грудное вскармливание у женщины, и женщина детородного возраста, не использующая приемлемый способ контроля рождаемости.

16. История несоблюдения схем лечения или пациенты, которые считаются потенциально ненадежными, не готовыми к взаимодействию.

Пациенты получали лечение с помощью MOR00208 следующим образом. Пациенты получали лечение двумя 28-дневными циклами, где MOR00208 давали в дозе 12 мг/кг в дни 1, 8, 15 и 22. По окончании двух циклов пациенты, имеющие стабильное заболевание или лучше, получали третий 28-дневный цикл, применяя те же дозы и график, что и в первых двух циклах. По окончании третьего цикла пациенты, имеющие частичный ответ или лучше, переходили на поддерживающую терапию. В режиме поддерживающей терапии MOR00208 вводили в дозе 12 мг/кг каждые 14 или 28 дней до прогрессирования заболевания.

По состоянию на конец исследования характеристики пациентов были такими, как приведены ниже.

Таблица 2

Исходные характеристики					
Характеристика		DLBCL n=35	iNHL n=45	MCL n=12	Итого n=92
Возраст, лет	Срединное значение	71	66	64,5	66,5
Пол	Мужской	24 (69)	21 (47)	11 (92)	56 (61)
ECOG PS	0	20 (57)	33 (73)	7 (58)	60 (65)
	1	12 (34)	11 (24)	4 (33)	27 (29)
	2	3 (9)	1 (2)	1 (8)	5 (5)
Резистентность к ритуксимабу	Да	24 (69)	22 (49)	6 (50)	52 (57)
	Нет	11 (31)	23 (51)	6 (50)	40 (43)
Последняя доза ритуксимаба	<6 мес.	14 (40)	6 (13)	1 (8)	21 (23)

Предшествующая трансплантация стволовых клеток	Да	2 (6)	7 (16)	1 (8)	10 (11)
DoR до последней предшествующей терапии	>12 месяцев	3 (9)	18 (40)	4 (33)	25 (27)
	≤12 месяцев	26 (74)	25 (56)	7 (58)	58 (63)
	Неизвестно	6(17)	2(4)	1 (8)	9(10)
Исходное количество NK-клеток	>100 клеток/мкл	19 (54)	23 (51)	8 (67)	51 (55)
	<100 клеток/мкл	11 (31)	8 (18)	1 (8)	20 (22)
	Неизвестно	5 (14)	14 (31)	3 (25)	21 (23)
Исходная экспрессия CD16 на NK-клетках	> 60000 ABC	15 (43)	33 (73)	5 (42)	53 (58)
	< 60000 ABC	11 (31)	5 (11)	4 (33)	20 (22)
	Неизвестно	9 (26)	7 (16)	3 (25)	19 (21)
Исходное количество Т-клеток	> 500 клеток/мкл	20 (57)	26 (58)	8 (67)	54 (59)
	≤ 500 клеток/мкл	10 (29)	6 (13)	1 (8)	17 (18)
	Неизвестно	5 (14)	13 (29)	3 (25)	21 (23)
FcyRIIIa	Высокая аффинность	5 (14)	4 (9)	1 (8)	10 (11)
	Низкая аффинность	27 (77)	28 (62)	9 (57)	64 (70)
	Неизвестно	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (20)
FcyRIIa	Высокая аффинность	11 (31)	10 (22)	3 (25)	24 (26)
	Низкая аффинность	21 (60)	22 (49)	7 (58)	50 (54)
	Неизвестно	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (18)

DLBCL, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома;

ECOG PS, функциональный статус согласно Восточной объединенной онкологической группе;

iNHL, индолентная неходжкинская лимфома (включая фолликулярную лимфому и другие iNHL);

MCL, лимфома из клеток мантийной зоны;

мес. - месяцы

Другое iNHL означает гетерогенную группу, дополнительно не уточняемых индолентных не агрессивных типов NHL, например лимфому маргинальных клеток, лимфому маргинальной зоны и лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT).

Основные первичные и вторичные конечные точки были такими, как приведены ниже.

Первичная: общая частота ответа (ORR)=CR+PR.

Вторичная: частота контроля заболевания (DCR)=CR+PR+SD выживаемость без прогрессировать (PFS).

Таблица 3

Ответ				
Лучший общий ответ,* n (%)	DLBCL n=35	iNHL[†] n=45	MCL n=12	Итого n=92
Полный ответ, CR	2 (6)	5 (11)	0	7 (8)
Частичный ответ, PR	7 (20)	8 (18)	0	15 (16)
Стабильное заболевание, SD	5 (14)	20 (44)	6 (50)	31 (34)
Прогрессирующее заболевание	11 (31)	7 (16)	5 (42)	23 (25)
Оценка отсутствует [‡]	10 (29)	5 (11)	1 (8)	16 (17)
DCR (CR+PR+SD)	14 (40)	33 (73)	6 (50)	53 (58)
ORR (CR+PR/все пациенты)	9 (26)	13 (29)	0	22 (24)
ORR (CR+PR/пациенты с оценкой [§])	9 (36)	13 (33)	0	22 (29)

Данные представляют собой n (%).

*По оценке исследователя;

[†] включает фолликулярную лимфому и другие индолентные NHL;

[‡] Оценку ответа после исходного уровня не проводили/данные недоступны;

[§] n=25, 40, 11 и 76 соответственно;

DCR, частота контроля заболевания;

DLBCL, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома;

iNHL, индолентная неходжкинская лимфома;

MCL, лимфома из клеток мантийной зоны;

ORR, общая частота ответа

Критериями ответа в этом исследовании являются те, которые определены в табл. 4. Все они основаны на критериях ответа согласно Международной рабочей группы (2007 г.).

Таблица 4. Критерии ответа

Ответ	Определение	Значения массы узлов	Селезенка, печень	Костный мозг
CR	Исчезновение всех признаков заболевания	а) FDG-avidный или PET-положительный до лечения; масса любого размера разрешена, если PET-отрицательный б) Вариабельный FDG-avidный или PET-отрицательный; регрессия к нормальному размеру согласно СТ	Не пальпируемый, узлы исчезли	Инфильтрат устранен при повторной биопсии; если неопределимо по морфологии, иммуногистохимия должна быть отрицательной

PR	Регрессия измеряемого заболевания и отсутствие новых очагов	≥ 50%-е снижение SPD до 6 самых крупных доминантных масс; нет увеличения размера согласно СТ а) а) FDG-авидный или PET-положительный до лечения; один или несколько PET-положительных в ранее задействованном очаге б) переменный FDG-авидный или PET-отрицательный; регрессия согласно СТ	≥ 50%-е снижение SPD узлов (для единичного узла по большему поперечному диаметру); отсутствие увеличения размера печени или селезенки	Неприменимо, если положительный до лечения; следует указать тип клеток
SD	Отсутствие достижения CR/PR или PD	а) FDG-авидный или PET-положительный до терапии; PET-положительный на предыдущих очагах заболевания и отсутствие новых очагов согласно СТ или PET б) переменный FDG-авидный или PET-отрицательный; никаких изменений в размере предыдущих поражений согласно СТ		
Рецидив заболевания или PD	Любое новое поражение или увеличение на ≥ 50% от самого низкого уровня ранее вовлеченных очагов	Появление нового(-ых) поражения(-ий) > 1,5 см по любой оси, ≥ 50% увеличение SPD более чем одного узла или ≥ 50% увеличение самого длинного диаметра ранее идентифицированного узла > 1 см по короткой оси Поражения PET-положительные, в случае FDG-авидной лимфомы или PET-положительной до терапии	> 50% увеличение от самого низкого уровня SPD любых предыдущих поражений	Новое или рекуррентное поражение

Сокращения: CR, полная ремиссия;
FDG, [¹⁸F]фтордезоксиглюкоза;
PET, позитронно-эмиссионная томография;
СТ, компьютерная томография;
PR, частичная ремиссия;
SPD, сумма произведений диаметров;
SD, стабильное заболевание;
PD, прогрессирующее заболевание

DCR (CR+PR+SD) считалась наиболее подходящей конечной точкой эффективности анализа характеристик и биомаркеров пациента в этом испытании, так как большинство пациентов с SD отмечали уменьшение целевых поражений, но согласно плану исследования не получали лечение после цикла 3. Соответственно пациенты с SD включены в анализ.

По меньшей мере, следующие характеристики пациентов оценивали для определения того, существует ли корреляция между характеристикой и наблюдаемой DCR у пациентов, получивших лечение антителом к CD19: а) возраст, б) пол, в) получали ли пациенты дозу ритуксимаба в течение последних 6 месяцев, д) были ли пациенты резистентными к ритуксимабу, е) имеют ли пациенты аллель FCgammaIIIa высокой или низкой аффинности, ф) имеют ли пациенты аллель FCgammaIIIa высокой или низкой аффинности, г) была ли у пациентов длительность ответа на предыдущее лечение большей чем 12 месяцев, h) исходные количества периферических Т-клеток (клетки/мкл), i) исходное количество периферических NK-клеток (клетки/мкл) и j) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических NK-клетках (количество связанных антител на клетку - ABC).

Пример 1 и пример 2 выше использовали для оценки исходных количеств периферических NK-

клеток, количеств Т-клеток и исходного уровня экспрессии CD16 на периферических НК-клетках. Данные показаны в табл. 2.

Анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) использовали для анализа прогнозируемости, специфичности и чувствительности, а также для определения пределов отсеечения для потенциальных биомаркеров количества НК-клеток, количества Т-клеток и уровня экспрессии CD16 (ABC) на периферических НК-клетках. График ROC отображает эффективность способа двоичной классификации с непрерывным или дискретным порядковым выходом. Он показывает чувствительность (долю правильно классифицированных положительных наблюдений) и специфичность (долю правильно классифицированных отрицательных наблюдений), поскольку пороговое значение выхода перемещается в диапазоне всех возможных значений. См. Swets JA: The Relative Operating Characteristic in Psychology. Science 1973, 182: 990-1000 и Pepe MS: The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford: Oxford University Press; 2003. В контексте ROC с помощью площади под кривой (AUC) измеряют эффективность классификатора и ее часто применяют для сравнения способов. Более высокая AUC означает лучшую классификацию. AUC для количеств периферических НК/Т-клеток и для уровня экспрессии CD16 на НК-клетках составляет 0,66, 0,53 и 0,61 соответственно (фиг. 3, 4 и 5).

В целом определение предела отсеечения зависит от цели, на которую направлен соответствующий способ. Различные критерии, такие как максимальная точность, максимальное диагностическое отношение шансов, минимальная частота ошибок, максимальная чувствительность и/или максимальная специфичность, приведут к другому определению предела отсеечения. Кроме того, баланс между большим количеством таких критериев, например чувствительностью и специфичностью, также приведет к конкретному определению предела отсеечения.

Поэтому существует несколько способов или критериев для выбора оптимальных пределов отсеечения, включая способы, увеличивающие до максимума точность, чувствительность+специфичность, прогностические значения, диагностические коэффициенты правдоподобия или распространенность. Из-за асимметрии ROC-кривой для уровня экспрессии CD16 (см. фиг. 4) большинство способов приводят к пределу отсеечения, составляющему 60000 ABC (точки с наибольшим расстоянием между ROC-кривой и биссектрисой), тогда как симметрия ROC-кривой для количества НК-клеток (см. фиг. 3) объясняет, почему при применении разных способов могут быть получены разные значения для наилучшего предела отсеечения. В этом конкретном исследовании для обоих биомаркеров больший вес был отнесен к чувствительности, и поэтому 100 НК-клеток/мкл и уровень экспрессии CD16 в 60000 ABC соответственно выбрали в качестве пределов отсеечения для анализа DCR и PFS в подгруппах. Для количеств периферических Т-клеток AUC равна 0,53, а ROC-кривая близка к биссектрисе при любом значении специфичности и чувствительности, поэтому даже выбор отличного от 500 клеток/мкл предела отсеечения не повлиял на отрицательные результаты анализа DCR и PFS в подгруппах.

Определение предела отсеечения может быть сбалансировано в пользу либо чувствительности, либо специфичности. Если еще больший вес относят к чувствительности, для идентификации оптимального предела отсеечения данный способ будет отличным, и предполагается более низкий предел отсеечения для количества НК-клеток. В этом случае определяют предел отсеечения по меньшей мере 50 НК-клеток/мкл. В качестве альтернативы определяют предел отсеечения, составляющий по меньшей мере 60 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 70 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 80 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 90 НК-клеток/мкл или по меньшей мере 100 НК-клеток/мкл.

Для увеличения до максимума специфичности раскрытого способа предел отсеечения для количества НК-клеток увеличивают и определяют от по меньшей мере 100 НК-клеток/мкл до по меньшей мере 150 НК-клеток/мкл. Поэтому для увеличения до максимума специфичности выбирают предел отсеечения, составляющий по меньшей мере 100 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 110 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 120 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 130 НК-клеток/мкл, по меньшей мере 140 НК-клеток/мкл или по меньшей мере 150 НК-клеток/мкл.

Значения предела отсеечения, определенные в этом конкретном исследовании (100 НК-клеток/мкл и уровень экспрессии CD16 в 60000 ABC), использовали для следующего статистического анализа.

Диаграммы Фореста использовали для анализа всех характеристик и биомаркеров пациента, чтобы определить корреляцию отдельной характеристики с DCR. Результаты показаны на фиг. 7. На основании анализа диаграмм Фореста различных характеристик пациента и их корреляции с DCR у пациентов с DLBCL и iNHL следующие характеристики показали статистически значимые различия: 1) исходное количество периферических НК-клеток, составляющее по меньшей мере 100 клеток/мкл, и исходный уровень экспрессии CD16 на периферических НК-клетках, составляющий по меньшей мере 60000 ABC (нескорректированное по χ^2 значение $p=0,029/0,003$) (фиг. 7).

Чтобы гарантировать, что уровень экспрессии CD16 и количество НК-клеток являются независимыми характеристиками, которые не влияли друг на друга, провели параметрический и непараметрический корреляционный анализ. Данные об уровне экспрессии CD16 и количестве НК-клеток были доступны для 51 пациента. Коэффициент Пирсона r составил 0,019 с двухсторонним значением $p=0,9$, а коэффициент Спирмана r составил 0,036 с двухсторонним значением $p=0,8$. Результаты графически представлены на фиг. 6. В заключение, уровень экспрессии CD16 и количество НК-клеток при определенных

пороговых значений не коррелируют, поэтому они считаются полностью независимыми прогностическими параметрами вероятности того, что пациент получит пользу от лечения с помощью MOR00208.

Следующие характеристики не были признаны прогностическими для DCR: а) возраст, б) пол, в) получали ли пациенты дозу ритуксимаба в течение последних 6 месяцев, д) были ли пациенты резистентными к ритуксимабу, е) имеют ли пациенты аллель FCgammaRIIIa высокой или низкой аффинности, ф) имеют ли пациенты аллель FCgammaRIIIa высокой или низкой аффинности, г) была ли у пациентов длительность ответа на лечение большей чем 12 месяцев или h) исходные количества периферических Т-клеток. См. фиг. 7.

Как 1) исходные количества периферических НК-клеток, так и 2) исходный уровень экспрессии CD16 на периферических НК-клетках показали явные корреляции с ответом пациентов на терапию с помощью MOR00208. В частности, у пациентов, имеющих исходное количество НК-клеток по меньшей мере 100 клеток/мкл, наблюдалась корреляция с более высокой частотой контроля заболевания (DCR). DCR включает пациентов, характеризующихся полным ответом (CR) + частичным ответом (PR) + стабильным заболеванием (SD). В дополнение, у пациентов, имеющих исходный уровень экспрессии CD16 на НК-клетках в количестве по меньшей мере 60000 ABC, наблюдалась корреляция с более высокой частотой контроля заболевания (DCR).

Выживаемость без прогрессирования (PFS) представляет собой продолжительность времени в ходе и после лечения заболевания, когда пациент живет с заболеванием, но оно не ухудшается. Это дополнительная важная конечная точка клинического испытания и показатель эффективности у пациентов. PFS сравнивали в рамках следующих характеристик пациента: а) исходного количества периферических НК-клеток, составляющего по меньшей мере 100 клеток/мкл или менее, б) исходного уровня экспрессии CD16 на периферических НК-клетках, составляющего по меньшей мере 60000 ABC или менее, и в) исходного количества периферических Т-клеток, составляющего по меньшей мере 500 клеток/мкл или менее. Результаты показаны на фиг. 8-10. Сравнение PFS пациентов с количествами НК-клеток, составляющими по меньшей мере 100 клеток/мкл, относительно пациентов с более низкими количествами НК-клеток показало статистически значимую разницу с HR 0,1561 ($p=0,0003$ для нескорректированного логрангового критерия). Это дополнительно подтверждает прогностичность количества НК-клеток при ответе пациентов, получающих лечение с помощью MOR00208, для пациентов с CLL, NHL, ALL или SLL.

Следует понимать, что описание, конкретные примеры и данные с указанием иллюстративных вариантов осуществления приведены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Различные изменения и модификации в соответствии с настоящим изобретением станут очевидными для специалиста в данной области из рассмотрения, раскрытия и данных, содержащихся в данном документе, и поэтому рассматриваются как часть настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации субъекта, имеющего хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL) или острый лимфобластный лейкоз (ALL), который отвечает на лечение антителом к CD19, при этом указанный способ включает:

- а) взятие образца крови, полученного от указанного субъекта до лечения указанным антителом к CD19,
- б) определение уровня по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце, выбранного из группы, состоящей из:
 - i) количества периферических НК-клеток и
 - ii) уровня экспрессии CD16 на периферических НК-клетках,
- с) сравнение уровня указанного по меньшей мере одного биомаркера в указанном образце с заданным уровнем отсечения,

где уровни указанного по меньшей мере одного биомаркера, соответствующие заданному уровню отсечения или превышающие его, указывают на субъекта, который получит пользу от лечения антителом к CD19.

2. Способ по п.1, где заданный уровень отсечения указанного биомаркера представляет собой:

- а) исходное количество НК-клеток, составляющее по меньшей мере 50 клеток/мкл, или
- б) исходные уровни экспрессии CD16 на периферических НК-клетках, составляющие по меньшей мере 60000 ABC (количество связанных антител на клетку).

3. Способ по п.1 или 2, где заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой:

- а) исходное количество периферических НК-клеток, составляющее по меньшей мере 60 клеток/мкл.

4. Способ по любому из пп.1-3, где заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой:

- а) исходное количество периферических НК-клеток, составляющее по меньшей мере 70 клеток/мкл.

5. Способ по любому из пп.1-4, где заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой:

- а) исходное количество периферических НК-клеток, составляющее по меньшей мере 80 клеток/мкл.

6. Способ по любому из пп.1-5, где заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой:

а) исходное количество периферических НК-клеток, составляющее по меньшей мере 100 клеток/мкл.

7. Способ по любому из пп.1-6, где заданное отсечение указанного биомаркера представляет собой:

а) исходные уровни экспрессии CD16 на периферических НК-клетках, составляющие по меньшей мере 60000 ABC.

8. Способ по любому из пп.1-7, где антитело к CD19 содержит область HCDR1, предусматривающую последовательность SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2, предусматривающую последовательность NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3, предусматривающую последовательность GTYY-YGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1, предусматривающую последовательность RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2, предусматривающую последовательность RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), и область LCDR3, предусматривающую последовательность MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

9. Способ по любому из пп.1-8, где антитело к CD19 содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDY
WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK
(SEQ ID NO: 11).

10. Способ по любому из пп.1-9, где антитело к CD19 содержит тяжелую цепь с последовательностью

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYND
GTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAKEEKTIS
KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 8)

и легкую цепь с последовательностью

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSN
LNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9).

11. Способ по любому из пп.1-10, где указанный субъект имеет неходжкинскую лимфому.

12. Способ по п.11, где неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и лимфомы из клеток мантимальной зоны.

13. Способ по п.11, где неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

14. Способ по п.11, где неходжкинская лимфома представляет собой фолликулярную лимфому.

15. Способ по п.11, где неходжкинская лимфома представляет собой лимфому маргинальных клеток.

16. Способ по любому из пп.1-10, где указанный субъект имеет хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

17. Способ по любому из пп.1-10, где указанный субъект имеет мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL).

18. Способ по любому из пп.1-10, где указанный субъект имеет острый лимфобластный лейкоз (ALL).

19. Применение антитела к CD19 для лечения пациента с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), неходжкинской лимфомой (NHL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL) или острым

лимфобластным лейкозом (ALL), идентифицированного в соответствии со способом по любому из пп.1-10.

20. Применение по п.19, где указанный пациент имеет неходжкинскую лимфому.

21. Применение по п.20, где неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и лимфомы из клеток мантийной зоны.

22. Применение по п.20, где неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

23. Применение по п.20, где неходжкинская лимфома представляет собой фолликулярную лимфому.

24. Применение по п.20, где неходжкинская лимфома представляет собой лимфому маргинальных клеток.

25. Применение по п.19, где указанный пациент имеет хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

26. Применение по п.19, где указанный пациент имеет мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL).

27. Применение по п.19, где указанный пациент имеет острый лимфобластный лейкоз (ALL).

28. Способ лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL) или острого лимфобластного лейкоза (ALL) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела к CD19, где пациента идентифицируют в соответствии со способом по любому из пп.1-10.

29. Способ по п.28, где указанный пациент имеет неходжкинскую лимфому.

30. Способ по п.29, где неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек, лимфомы маргинальной зоны, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и лимфомы из клеток мантийной зоны.

31. Способ по п.29, где неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

32. Способ по п.29, где неходжкинская лимфома представляет собой фолликулярную лимфому.

33. Способ по п.29, где неходжкинская лимфома представляет собой лимфому маргинальных клеток.

34. Способ по п.28, где указанный пациент имеет хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

35. Способ по п.28, где указанный пациент имеет мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL).

36. Способ по п.28, где указанный пациент имеет острый лимфобластный лейкоз (ALL).

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи MOR00208 (CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты):

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIG
YI NPYNDGTKYN E KFQG R VTISS D KSISTA YM E LSSLRS E DTAM YYCA
RGJYYY GTRVFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи MOR00208 (CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты):

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQ
LLIYRMSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFG
AGTKLEIK (SEQ ID NO: 11)

Аминокислотная последовательность HCDR1 MOR00208: SYVMH (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность HCDR2 MOR00208: NPYNDG (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность HCDR3 MOR00208:
GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность LCDR1 MOR00208:
RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4)

Аминокислотная последовательность LCDR2 MOR00208: RMSNLNS (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотная последовательность LCDR3 MOR00208: MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6)

Фиг. 1

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи MOR00208:

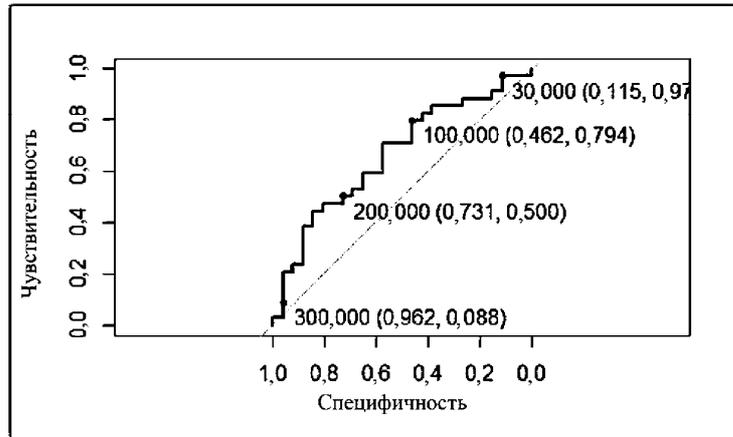
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPYNDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYY
GTRVFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPYDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

Аминокислотная последовательность легкой цепи MOR00208:

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQ
LLIYRMSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO: 9)

Фиг. 2

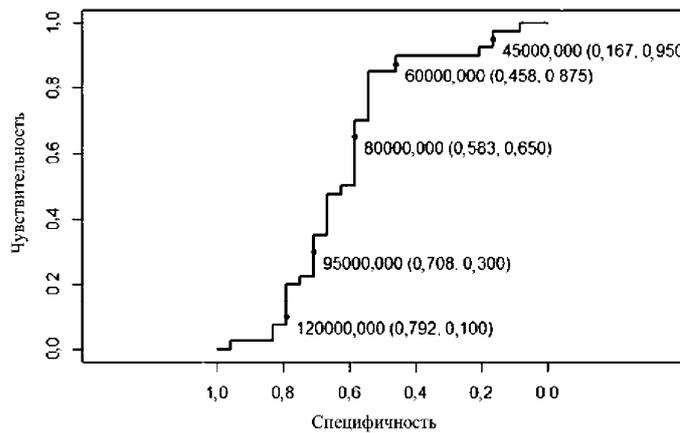
Определение пределов отсечения для количеств периферических НК-клеток при помощи ROC-анализа



Анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) количества периферических НК-клеток (клетки/мкл) в качестве прогностического параметра для частоты контроля заболевания (CR, PR, DS против PD, ET) у пациентов с DLBCL и iNHL. Отображены различные пределы отсечения со значениями специфичности и чувствительности. AUC = 0,66. CR - полная ремиссия, PR - частичная ремиссия, SD - стабильное заболевание, PD - прогрессирующее заболевание, ET - раннее прекращение, ABC - количество связанных антител на клетку.

Фиг. 3

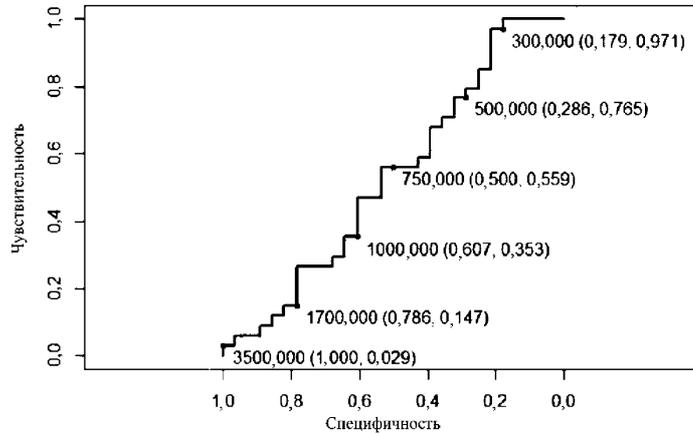
Определение пределов отсечения для экспрессии CD16 (ABC) при помощи ROC-анализа



Анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) экспрессии CD16 (ABC) в качестве прогностического параметра для частоты контроля заболевания (CR, PR, DS против PD, ET) у пациентов с DLBCL и iNHL. Отображены различные пределы отсечения со значениями специфичности и чувствительности. AUC = 0,61. CR - полная ремиссия, PR - частичная ремиссия, SD - стабильное заболевание, PD - прогрессирующее заболевание, ET - раннее прекращение, ABC - количество связанных антител на клетку.

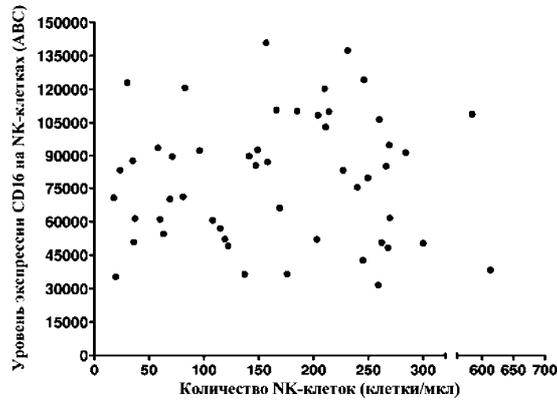
Фиг. 4

Определение пределов отсечения для количества периферических Т-клеток при помощи ROC-анализа



Анализ "рабочей характеристики приемника" (ROC) количества периферических Т-клеток (клетки/мкл) в качестве прогностического параметра для частоты контроля заболевания (CR, PR, DS против PD, ET) у пациентов с DLBCL и iNHL. Отображены различные пределы отсечения со значениями специфичности и чувствительности. AUC = 0,53. CR - полная ремиссия, PR - частичная ремиссия, SD - стабильное заболевание, PD - прогрессирующее заболевание, ET - раннее прекращение, ABC - количество связанных антител на клетку.

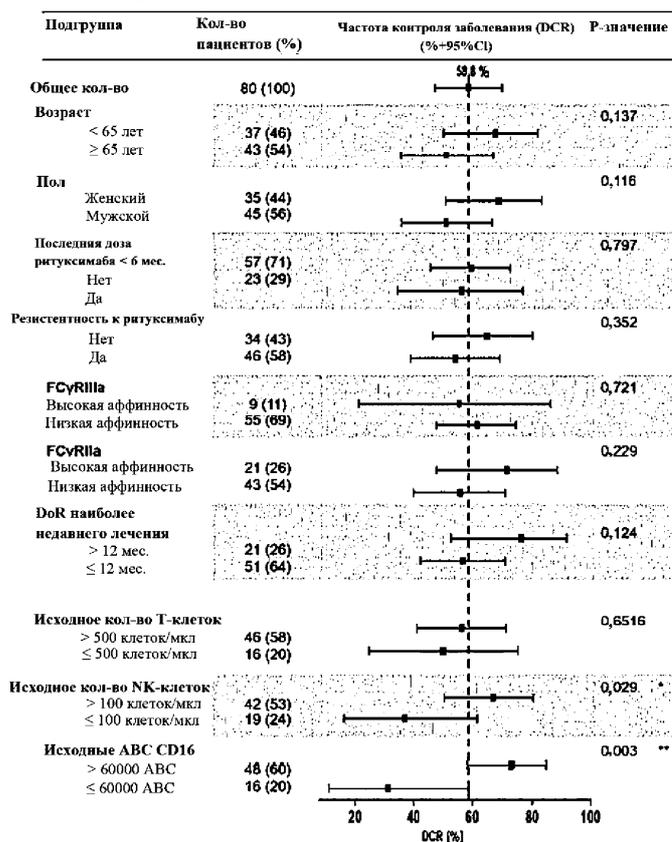
Фиг. 5



ABC - количество связанных антител на клетку. Анализ корреляции: коэффициент Пирсона $r = 0,019$ с двухсторонним значением $p = 0,9$; непараметрический коэффициент Спирмана $r = 0,036$ с двухсторонним значением $p = 0,8$; $n = 51$.

Фиг. 6

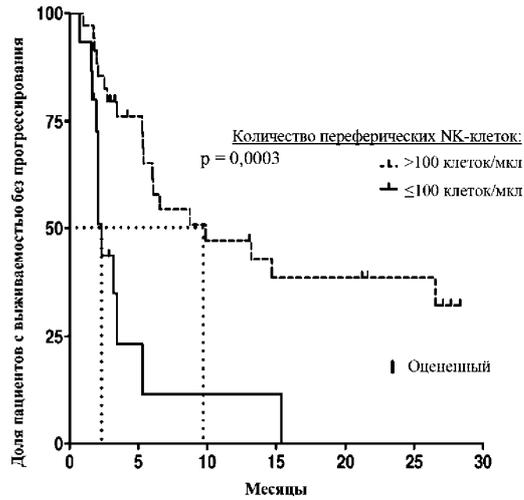
Диаграмма Фроста с анализом подгрупп частоты контроля заболевания



†Доверительные интервалы по способу Клоппера-Пирсона;
‡нескорректированный критерий χ^2 (двусторонний) частот DCR. DoR, длительность ответа; IPI, международный прогностический индекс. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Фиг. 7

Анализ подгруппы выживаемости без прогрессирования (PFS)



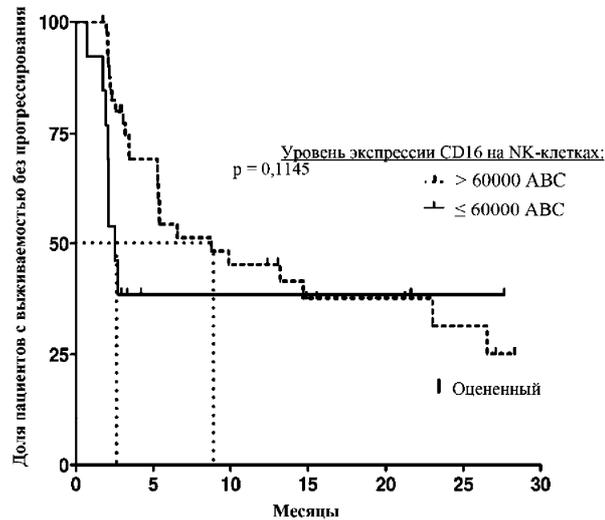
Количество
пациентов с
риском:

>100 клеток/мкл	35	21	12	9	9	6
≤100 клеток/мкл	15	2	1	1	0	0

Пациентов без радиологической оценки опухоли после исходного уровня просматривали на исходном уровне. PFS, выживаемость без прогрессирования. $p = 0,0003$ для нескорректированного логрангового критерия.

Фиг. 8

Анализ подгруппы выживаемости без прогрессирования (PFS)



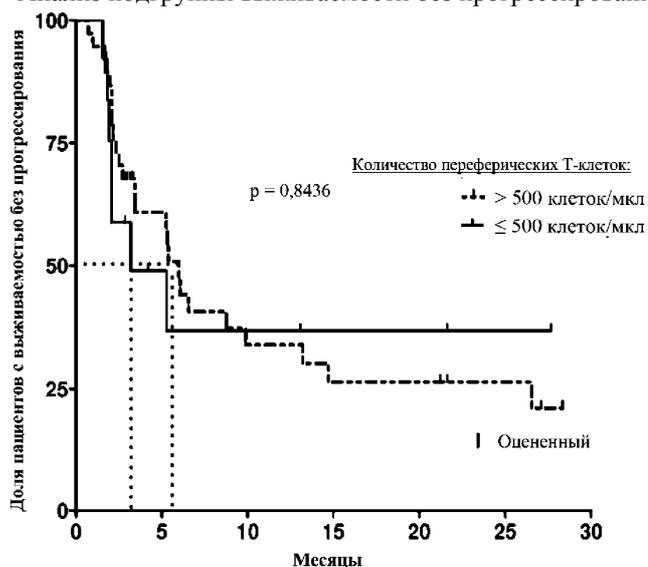
Количество
пациентов с
риском:

> 60000 ABC	42	25	14	9	8	5
≤ 60000 ABC	13	2	2	2	2	1

Пациентов без радиологической оценки опухоли после исходного уровня просматривали на исходном уровне. PFS, выживаемость без прогрессирования. $p = 0,1145$ для нескорректированного логрангового критерия.

Фиг. 9

Анализ подгруппы выживаемости без прогрессирования (PFS)

Количествопациентов с риском:

> 500 клеток/мкл	38	18	9	7	7	5
≤ 500 клеток/мкл	13	4	3	2	2	1

Пациентов без радиологической оценки опухоли после исходного уровня просматривали на исходном уровне. PFS, выживаемость без прогрессирования. p = 0,8436 для нескорректированного логрангового критерия.

Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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