



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.11

(21) Номер заявки
201691055

(22) Дата подачи заявки
2014.11.21

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) ПРЕПАРАТЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ GD2-ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА

(31) 13193953.0; 2834000; 14/086,696;
14/182,776

(32) 2013.11.21; 2013.11.21; 2013.11.21;
2014.02.18

(33) EP; CA; US; US

(43) 2016.11.30

(86) PCT/EP2014/075315

(87) WO 2015/075194 2015.05.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АПЕЙРОН БИОЛОДЖИКС АГ (АТ)

(72) Изобретатель:
**Лойбнер Ханс, Мучлехнер Оливер,
Ладенштайн Рут, Клир Изабель (АТ)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) ALICE L. YU ET AL.: "Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 363, № 14, 30 September 2010 (2010-09-30), p. 1324-1334, XP055045834, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa0911123, cited in the application, the whole document

R. HANDGRETINGER ET AL.: "A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 31, № 2, 1 January 1995 (1995-01-01), p. 261-267, XP055045925, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/0959-8049(94)00413-Y, p. 262, fig. 2, table 4

T. SIMON: "Consolidation Treatment With Chimeric Anti-GD2-Antibody ch14.18 in Children Older Than 1 Year With Metastatic Neuroblastoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 22, № 17, 26 July 2004 (2004-07-26), p. 3549-3557, XP055109509, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2004.08.143, p. 3550, right-hand column, fig. 1

KUSHNER B.H. ET AL.: "Phase II trial of the anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 19, № 22, 15 November 2001 (2001-11-15), p. 4189-4194, XP002714904, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, ISSN: 0732-183X, p. 4190, left-hand column, paragraph 4th full - paragraph 6th, tables 1, 2

MURRAY J.L. ET AL.: "Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged

intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 12, № 1, 1 January 1994 (1994-01-01), p. 184-193, XP009165391, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, ISSN: 0732-183X, p. 184-185

GAINS JENNIFER ET AL.: "Ten challenges in the management of neuroblastoma", FUTURE ONCOLOGY, vol. 8, № 7, July 2012 (2012-07), p. 839-858, XP002722246 (LONDON, ENGLAND), ISSN: 1744-8301, p. 845-846, left-hand column

Anonymous: "Press Release: Oncology Alliance. Apeiron, CCRI and SIOPEN Join Forces against Neuroblastoma", Apeiron Biologies AG., 22 June 2011 (2011-06-22), p. 8PP, XP002722247, Vienna, retrieved from the Internet: URL: <http://www.life-sciences-germany.com/news/apeiron-ccri-siopen-neuroblastoma-biologies-group-forschungs-und-2001-97329.html> [retrieved on 2014-03-20], p. 2, last paragraph

Anonymous: "HiGH RISK NEUROBLASTOMA STUDY I OF SIOPEN-EUROPE (SIOPEN)", SIOPEN, 1 July 2009 (2009-07-01), p. 1-303, XP002722380, retrieved from the Internet: URL: http://www.oncouvergne.fr/index.php?option=com_d ocman&task=doc_download&gid=928&Itemid= [retrieved on 2014-03-27], p. 107-117

LODE H. AND DOBKE J.: "A Phase I/II Dose Schedule Finding Study of ch14.18/CHO Continuous Infusion Combined with Subcutaneous Aldesleukin (=Proleukin) (IL-2) in Patients with Primary Refractory or Relapsed Neuroblastoma. A SIOPEN Study", INTERNET CITATION, 11 April 2012 (2012-04-11), p. 1-3, XP002688973, retrieved from the Internet: URL: http://www.kinderkrebsinfo.de/health_professionals/clinical_trial_s/phase_i_ii_trials_in_the_gpoh/longtermnfusion_study_lti_ch1418/index_eng.html [retrieved on 2012-12-10], p. 1, paragraph first-second

HOLGER LODE ET AL.: "Long-term continuous infusion of anti-GD2 antibody CH14.18/CHO in relapsed/refractory neuroblastoma patients", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 1, № Suppl 1, P244, 7 November 2013 (2013-11-07), XP021167203, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-1-S1-P244, the whole document

VICTORIA CASTEL ET AL.: "Treatment of high-risk neuroblastoma with anti-GD2 antibodies", CLINICAL AND TRANSLATIONAL ONCOLOGY, vol. 12, № 12, 1 December 2010 (2010-12-01), p. 788-793, XP055109508, ISSN: 1699-048X, DOI: 10.1007/s12094-010-0600-y, p. 790-792, table 1

-
- (57) Изобретение касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего химерное или гуманизованное антитело против GD2, причем пациент не получает одновременно интерлейкин-2 (IL-2). Кроме того, изобретение касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания без одновременного введения IL-2. Настоящее изобретение также касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента, причем одному или нескольким периодам введения антитела предшествуют, сопровождают их и/или следуют за ними один или несколько периодов введения ретиноида.

043975 B1

043975 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение имеет отношение к препаратам и способам лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего химерное или гуманизованное антитело против GD2, причем пациент не получает одновременно интерлейкин-2 (IL-2). В частности, изобретение касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего химерное или гуманизованное антитело против GD2, причем пациент не получает одновременно интерлейкин-2 (IL-2), а в некоторых воплощениях также не получает колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) и/или один или несколько других цитокинов. Кроме того, изобретение касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней без одновременного введения IL-2. Изобретение также касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента путем введения пациенту препарата, содержащего антитело против GD2, без одновременного введения IL-2, причем одному или нескольким периодам введения антитела предшествуют, сопровождают их и/или следуют за ними один или нескольких периодов введения ретиноида. Изобретение также касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака путем введения препарата, содержащего антитело против GD2, в виде непрерывного вливания пациенту в течение 24 ч в сутки, причем пациент не получает одновременно интерлейкин-2 (IL-2), при этом одному или нескольким периодам введения антитела может предшествовать, сопровождать их и/или следовать за ними один или нескольких периодов введения ретиноида.

Предшествующий уровень техники

Нейробластома после рака головного мозга является наиболее частой формой твердого рака у детей в возрасте до пяти лет. При нейробластоме с высокой степенью риска более чем у половины пациентов, получающих стандартное лечение, происходят рецидивы и в конечном счете они умирают от этой болезни. 90% случаев возникает в возрасте от нуля до шести лет. Во всем мире заболеваемость в промышленно развитых странах составляет около 2000 случаев в год.

В онкологии все чаще применяются моноклональные антитела против определенных антигенов. Совершенно иной способ действия по сравнению с цитотоксической терапией делает их ценным активом, как это показали первые их представители типа трастузумаб, цетуксимаб, бевацизумаб, ритуксимаб и др. Дисialogанглиозид GD2 - это гликофинголипид, который экспрессируется главным образом на поверхности клетки. В нормальных тканях экспрессия GD2 встречается редко и в основном ограничивается центральной нервной системой (ЦНС), периферическими нервами и меланоцитами. В раковых клетках GD2 равномерно экспрессируется в нейробластомах и большинстве меланом и в различной степени в саркомах костной и мягких тканей, мелкоклеточном раке легких, почечно-клеточном раке и опухолях головного мозга (Navid et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 2010, 10:200-209). Вследствие относительно избирательной экспрессии в опухолях в сочетании с его присутствием на клеточной поверхности, GD2 представляет перспективную мишень для иммунотерапии рака на основе антител.

Соответственно несколько антител против GD2 проходят доклинические или клинические исследования при нейробластоме, меланоме и других связанных с GD2 раковых заболеваниях.

APN311 представляет собой препарат химерного моноклонального антитела ch14.18 против GD2, получаемого рекомбинантным способом в клетках яичников китайского хомячка (CHO), которые являются стандартной линией клеток млекопитающих для получения коммерчески доступных антител. В клиническом исследовании I фазы у больных с рецидивирующей/рефрактерной нейробластомой происходила ремиссия с этим антителом в качестве единственного средства. В 2006 г. Международным обществом детской онкологии и Европейской нейробластомы (SIOPEN) были начаты испытания III фазы, включающие применение APN311, и в настоящее время исследуется его действие на выживаемость без рецидива и общую выживаемость при применении APN311 вместе с изотретиноином, т.е. цис-ретиноевой кислотой (цис-RA), с подкожным введением IL-2 или без него. В сопоставимом исследовании в США при лечении пакетом из 4 препаратов, а именно родственного антитела, вырабатываемого в клетках мышинной гибридомы SP2/0, вместе с в/в интерлейкином-2 (IL-2 или IL2), колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) и изотретиноином, наблюдалось любопытное улучшение выживаемости у детей с нейробластомой при полной ремиссии после начальной терапии и без признаков заболевания.

APN301 представляет собой препарат иммуноцитокина, содержащий гуманизованное антитело против GD2 (hu14.18) и IL-2 в виде слитого белка. Антительная часть специфически связывается с антигеном GD2, который сильно экспрессируется при нейробластоме и некоторых других видах рака. IL-2 - цитокин, который рекрутирует несколько типов иммунных эффекторных клеток. У больных нейробластомой APN301 предназначается для локализации GD2-положительных опухолевых клеток посредством антительного компонента. После этого слитый IL-2 стимулирует иммунную систему пациента против опухоли путем активации клеток NK и Т-клеток, тогда как Fc-область антитела служит для запуска уничтожения опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Иммуноцитокин проявлял активность в клиническом исследовании II фазы у детей с рецидивирующей/рефрактерной нейробластомой (Shusterman et al., *JCO*, 2010, 28(33):4969-75), а также испытывался в исследовании I/II фазы на поздней стадии злокачественной

меланомы, проявляя активацию иммунной системы.

Другие антитела против GD2, которые находятся в процессе исследования или разработки, это, к примеру, моноклональное антитело 3F8 (мышинное во II фазе, а также гуманизованное в I фазе) и 8B6 (специфичное к О-ацетилованному GD2, доклиническое). Кроме того, проводились исследования антиидиотипических антител, таких, к примеру, как 4B5, 1A7 и A1G4, в качестве потенциальных противоопухолевых вакцин, однако от их разработки, видимо, отказались. В WO 2008/049643 также описаны антиидиотипические антитела, имитирующие эпитопы GD2, т.е. это мимеотопы GD2.

Другой вариант антитела 14.18 против GD2 представлен hu14.18K322A, как описано в WO 2005/070967, который содержит точечную мутацию в Fc-области с целью ослабления CDC, но сохраняет ADCC, например, при экспрессии в линии клеток, подходящей для усиления ADCC, типа YB2/0. Считается, что снижение CDC приводит к уменьшению боли, связанной с применением антител.

Противоопухолевая активность антител обычно проявляется либо через комплементзависимую цитотоксичность (CDC или фиксация комплемента), либо через антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Эти два вида активности известны в данной области как "эффекторные функции" и опосредуются антителами, в частности, класса IgG. Все подклассы IgG, кроме IgG4 (IgG1, IgG2, IgG3), опосредуют ADCC и связывание комплемента в некоторой степени, но самыми сильными для обоих видов активности являются IgG1 и IgG3. Считается, что ADCC происходит, когда Fc-рецепторы на клетках натуральных киллеров (NK) и/или других несущих Fc-рецепторы иммунных клетках (эффекторных клетках) связывается с Fc-областью антител, связанных с антигеном на поверхности клетки. Связывание с Fc-рецепторами дает сигнал эффекторным клеткам на уничтожение клеток мишени. Считается, что CDC протекает по нескольким механизмам; один механизм запускается при связывании антитела с антигеном на поверхности клетки. После того как образуется комплекс антиген-антитело, молекула C1q, как полагают, связывается с комплексом антиген-антитело. Затем C1q сам расщепляется, запуская каскад энзиматической активации и расщепления других белков комплемента, которые затем связываются с поверхностью клеток мишени и способствуют их гибели, к примеру, посредством лизиса клеток и/или поедания макрофагами.

Считается, что антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) играет важную роль в иммунотерапии. К сожалению, ADCC у раковых больных зачастую подавлена. Считается, что цитокины усиливают ADCC путем прямой активации клеток иммунной системы или путем усиления связанных с опухолью антигенов (ТАА) на опухолевых клетках. Например, алдезлейкин (IL-2) вызывает активацию клеток натуральных киллеров (NK), образование клеток активируемых лимфокинами киллеров (LAK) и усиливает ADCC. Алдезлейкин (IL-2) оказался эффективным, индуцируя измеримые противоопухолевые ответы у больных с почечно-клеточной карциномой и меланомой. Кроме того, было показано *in vitro* и *in vivo*, что GM-CSF усиливает противоопухолевый иммунитет посредством прямой активации моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и непрямо́й активации Т-клеток через TNF, интерферон и интерлейкин-1 (IL-2). Считается, что GM-CSF усиливает функции клеток, критические для иммунной активации против опухолевых клеток, по отдельности или с другими цитокинами или моноклональными антителами.

Итак, в текущих клинических испытаниях по исследованию антител против GD2, в частности ch14.18, применение антител сочетается с применением цитокинов (и ретиноидов), в особенности IL-2 и/или GM-CSF. Соответственно на предыдущем уровне техники учат, что больным с GD2-положительным раком выгодно вводить цитокины, в частности, в сочетании с применением антител против-CD2.

Напротив, один из ключевых аспектов изобретения состоит в том, что таких больных можно лечить с помощью антител против GD2 без IL-2, в частности, без применения каких-либо цитокинов.

Лечение с помощью одного или нескольких цитокинов в комбинации с антителом может иметь серьезные побочные эффекты, такие, например, как лихорадка, аллергические реакции, гипотензия, синдром капиллярной утечки и т.п., что даже может привести к смерти. Сопутствующее лечение цитокинами даже потенцирует побочные эффекты от применения антител, например, боль, так как существует синергизм по неблагоприятным эффектам от обоих препаратов. Однако с препаратами и способами настоящего изобретения можно полностью устранить любые цитокины. Таким образом, настоящее изобретение приводит к существенному снижению неблагоприятных эффектов лечения с помощью антител.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение касается препаратов, содержащих антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациентов, причем препарат, содержащий химерное или гуманизованное антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2, при этом происходит лечение GD2-положительного рака.

Далее изобретение касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий химерное или гуманизованное антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение 24 ч в сутки без одновременного введения IL-2. Настоящее изобретение также касается препаратов и способов лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий химерное или гуманизованное антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2, при этом одному или нескольким периодам введения антитела против GD2

предшествует, сопровождает их и/или следует за ними один или несколько периодов приема ретиноида. В некоторых воплощениях пациент не получает GM-CSF и/или одного или нескольких других цитокинов, в особенности не в пределах одного и того же цикла лечения.

Изобретение дополнительно определяется конкретными воплощениями и формулой изобретения. Все воплощения изобретения, как описано далее, относятся ко всем аспектам изобретения в равной степени и все эти аспекты могут комбинироваться, к примеру, первый со вторым или третьим, первый со вторым и третьим, второй с третьим, давая препарат для способа из комбинированных элементов этих аспектов; или давая комбинированные способы.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены кривые Каплана-Мейера по выживаемости без рецидива (EFS, фиг. 1А) и выживаемости в целом (OS, фиг. 1В) по данным (в процентах по времени) от 328 больных нейробластомой, получавших APN311 и изотретиноин, но без IL-2 (светло-серые), и пациентов, получавших APN311 и изотретиноин с IL-2 (темно-серые).

На фиг. 2 представлено сравнение данных по EFS (в процентах по времени) от 128 пациентов из примера 2, у которых была полная реакция (CR) в начале лечения (фиг. 2А, диаграмма справа), с данными по EFS (в процентах по времени) из Yu et al. 2010, New England Journal of Medicine, 363:1324-1334 (фиг. 2А, диаграмма слева, также включает данные полностью восприимчивых). На фиг. 2В представлено наложение диаграмм для сравнения.

На фиг. 3 представлено сравнение данных по OS (в процентах по времени) от 128 пациентов из примера 2, у которых была полная реакция (CR) в начале лечения (фиг. 3А, диаграмма справа), с данными по OS (в процентах по времени) из Yu et al., 2010 (фиг. 3А, диаграмма слева). На фиг. 3В представлено наложение диаграмм для сравнения.

На фиг. 4 и 5 представлены сводные таблицы по токсичности (фиг. 4: по всем уровням токсичности и отдельно только 3 и 4 степени; фиг. 5: по всем уровням токсичности для каждого цикла лечения), выраженной в процентах от общего числа обследованных пациентов, получавших лечение по соответствующей схеме с IL-2 и без него.

На фиг. 6 и 7 представлены соответствующие диаграммы по токсичности (фиг. 6: по всем уровням токсичности; фиг. 7: только 3 и 4 степени), отмеченной во всех циклах лечения, в процентах от общего числа обследованных пациентов, получавших лечение по соответствующей схеме с IL-2 и без него.

На фиг. 8 и 9 представлены диаграммы по всем уровням токсичности за каждый цикл лечения в процентах от общего числа обследованных пациентов, получавших лечение по соответствующей схеме с IL-2 (фиг. 9) и без IL-2 (фиг. 8).

На фиг. 10-15 представлены диаграммы по токсичности, наблюдавшейся в соответствующих циклах лечения (фиг. 10: цикл 1; фиг. 11: цикл 2; фиг. 12: цикл 3; фиг. 13: цикл 4; фиг. 14: цикл 5; фиг. 15: цикл 6), в процентах от общего числа обследованных пациентов, получавших лечение по соответствующей схеме с IL-2 и без него.

На фиг. 16 представлены результаты анализа комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (большие черные кружки, фиг. 16А) и анализа на цельной крови (большие черные кружки, WBT, фиг. 16В) из образцов крови пациента с нейробластомой во время лечения антителом против GD2, но без IL-2 с приемом цис-ретиноевой кислоты. Обведенные по периметру черным белые кружочки - пробы из образцов пациентов, получавших антиидиотипическое антитело для разграничения от любого возможного неспецифического лизиса (т.е. такого лизиса клеток мишени, который не опосредован антителами). Обведенные по периметру черным белые полосы обозначают периоды введения антитела.

На фиг. 17 представлены результаты анализа комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (большие черные кружочки, фиг. 17А) и анализа на цельной крови (большие черные кружочки, WBT, фиг. 17В) из образцов крови пациента с нейробластомой во время лечения антителом против GD2 с обычной дозой IL-2 и приемом цис-ретиноевой кислоты. Обведенные по периметру черным белые кружочки-пробы из образцов пациентов, получавших антиидиотипическое антитело для разграничения от любого возможного неспецифического лизиса (т.е. такого лизиса клеток мишени, который не опосредован антителами). Обведенные по периметру черным белые полосы обозначают периоды введения антитела, обведенные по периметру черным белые треугольнички - периоды приема IL-2, а черные звездочки - периоды приема цис-ретиноевой кислоты.

Подробное описание изобретения

Вопреки ожиданиям оказалось, что лечение одним или несколькими цитокинами в комбинации с антителом против GD2 и ретиноидом не дает никакого клинического преимущества перед лечением антителом против GD2 и ретиноидом, но без IL-2, или без IL-2 и без GM-CSF, или даже без какого-либо цитокина. Кроме того, оказалось, что схема лечения без IL-2 или других цитокинов в сочетании с непрерывным вливанием препарата, содержащего антитело против GD2, очень выгодна, в частности, в отношении снижения побочных эффектов, особенно боли.

В одном аспекте изобретения касается препарата, содержащего антитело против GD2 (также именуется как препарат антитела), для применения при лечении GD2-положительного рака у пациентов, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2,

при этом происходит лечение GD2-положительного рака у пациента.

В другом аспекте изобретение касается способа лечения GD2-положительного рака у пациентов, включающего введение пациенту препарата, содержащего антитело против GD2, без одновременного введения IL-2, при этом происходит лечение GD2-положительного рака у пациента.

В другом аспекте изобретение касается применения антитела против GD2 при приготовлении лекарственного средства для приведенных здесь способов.

В некоторых воплощениях антитело против GD2 вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение 24 ч в сутки. В некоторых воплощениях антитело против GD2 вводится пациенту в виде непрерывного вливания на протяжении одного или нескольких дней. В некоторых воплощениях пациент получает ретиноид один или несколько раз перед, во время и/или после введения антитела против GD2. В некоторых воплощениях антитело против GD2 является химерным или гуманизованным антителом против GD2.

Термин "пациент" в настоящем изобретении означает больного человека, страдающего GD2-положительным раком. Термин "лечение" или "лечится" в настоящем изобретении означает, что нуждающемуся в этом пациенту вводится препарат или проводится лечение.

Термин "лечение GD2-положительного рака у пациента" означает, что у данного пациента достигается терапевтический эффект, как определено дополнительно ниже.

Термины "одновременно обрабатывают" или "одновременно вводят" в настоящем изобретении означают, что одной обработке (например, антителом против GD2 и/или препаратом, содержащим антитело против GD2, что именуется введением антитела) предшествует, сопровождает ее и/или следует за ней одна или несколько других обработок (таких, например, как прием одного или нескольких анальгетиков и/или одного или нескольких других препаратов или средств), в частности, в пределах одного и того же цикла лечения и/или в пределах одного и того же общего времени лечения (например, при котором вводится антитело против GD2). Период проведения сопутствующего лечения может и не совпадать с другим периодом обработки (например, периодом введения антитела), либо частично, либо полностью. Соответственно период проведения сопутствующего лечения (например, приема анальгетиков) может предшествовать, сопровождать и/или следовать за периодом проведения другого лечения (например, периодом введения антитела). В одном воплощении периоды проведения сопутствующего лечения приходятся на один и тот же цикл лечения.

Соответственно термины "не обрабатывают одновременно", "без одновременного введения" или "не вводят одновременно" в настоящем изобретении означают, что одной обработке не предшествует, не сопровождает ее и/или не следует за ней одна или несколько других обработок соответственно. В одном воплощении вышеприведенные термины означают, что пациент не получает данного препарата или средства (т.е. данный препарат или средство не вводится данному пациенту) в пределах одного и того же цикла лечения и/или в пределах одного и того же общего времени лечения. Соответственно период проведения такой несопутствующей терапии (например, приема цитокина) не должен пересекаться с другим периодом обработки (например, периодом введения антитела), либо частично, либо полностью. В одном воплощении период проведения несопутствующего лечения не должен предшествовать, сопровождать и/или следовать за периодом проведения другой обработки (например, периодом введения антитела). В одном воплощении периоды проведения несопутствующего лечения не приходятся на один и тот же цикл лечения. Однако пациент, который не получает одновременно препарат или средство (например, один или несколько цитокинов), мог получать данный препарат или средство (например, один или несколько цитокинов) в предыдущих циклах лечения и/или во все время предыдущего лечения.

Термин "цитокины" в настоящем изобретении означает такие белки, пептиды или гликопротеины, которые действуют в качестве гормональных регуляторов или сигнальных молекул в наномолярных или пикомолярных концентрациях и участвуют в клеточной сигнализации. В одном воплощении один или несколько цитокинов выбирают из таких иммуномодулирующих средств, например, как интерлейкины и/или интерфероны. В одном воплощении один или несколько цитокинов выбирают из группы, состоящей из IL-2, GM-CSF, колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), IL-12 и/или IL-15. В одном воплощении один или несколько цитокинов не слиты с антителом, в частности не с антителом против GD2.

Термин "пониженная доза" или "низкая доза" в настоящем изобретении относится к таким дозам соответствующего препарата, которые значительно ниже, например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (или в любом промежутке между этими дозами) ниже, чем обычные дозы того же препарата при введении в таких же или похожих условиях, т.е. в таких же или близких группах пациентов при таком же или похожем лечении. Обычная доза может быть представлена дозой, которая часто использовалась в прошлом и/или в основном применяется в таких же или похожих условиях, т.е. в таких же или близких группах пациентов при таком же или похожем лечении. Доза может быть снижена за счет снижения суточной дозы и/или за счет снижения частоты и/или продолжительности введения. Например, для снижения дозы на 50% можно вводить соответствующий препарат при той же частоте или длительности, как обычно, но в виде лишь половины обычной суточной дозы, или же соответствующий препарат можно вводить в обычной суточной дозе, но, к примеру, только через день, если он обычно

вводился каждый день. В другом примере можно вводить 50% от обычной суточной дозы через день вместо обычного ежедневного приема, что приведет к тому, что доза уменьшится и будет на 75% меньше обычной дозы. Соответственно специалист в данной области сможет легко определить подходящие дозы и схемы введения в соответствии с изобретением.

"Период лечения" определенным препаратом или средством в настоящем изобретении означает период времени, в котором данный конкретный препарат или средство вводится пациенту в пределах одного цикла лечения, например, период времени следующих друг за другом дней лечения. Например, если препарат, содержащий цитокин, обычно вводится в течение 5 последовательных дней, за которыми следует один или несколько дней без приема препарата, содержащего цитокин, то период лечения препаратом, содержащим цитокин, составляет 5 дней. В другом примере, если препарат, содержащий антитело против GD2, вводится непрерывно в течение 24 ч на протяжении 10 последовательных дней, за которыми следует один или несколько дней без введения препарата, содержащего антитело против GD2, то период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, составляет 10 дней. В другом примере, если изотретиноин вводится два раза в день в течение 14 дней, за которыми следует один или несколько дней без приема препарата, то период лечения изотретиноином составляет 14 дней. Любые такие периоды лечения могут повторяться, полностью или частично перекрываться с другими периодами лечения другими препаратами или средствами и/или им могут предшествовать и/или за ними следовать периоды без лечения. Например, цикл лечения может составлять два 5-дневных периода лечения PL-2, причем второй из них перекрывается с 10-дневным (или 14-, 15- или 21-дневным) периодом лечения ch14.18 (APN311), а затем с 14-дневным периодом лечения изотретиноином.

Термины "в сочетании" или "сочетание" в настоящем изобретении в отношении периодов лечения означает, что два или несколько периодов лечения одним и тем же и/или различными препаратами или средствами заключаются в одном цикле лечения. Данные два или несколько периодов лечения различными препаратами или средствами могут частично или полностью перекрываться или же могут не перекрываться. Любые такие периоды лечения могут сочетаться с (или разделяться) одним или несколькими интервалами без приема тех же и/или других препаратов или средств.

Термин "цикл лечения" в настоящем изобретении означает курс одного или нескольких лечений или периодов лечения, который повторяется на регулярной основе, необязательно с периодами покоя (без лечения) между ними. Например, лечение, которое проводится в течение одной недели, за которой следуют три недели покоя, составляет один цикл лечения. В одном воплощении один цикл лечения включает один период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2. Цикл лечения, включающий один период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, может дополнительно включать один или несколько периодов лечения одним или несколькими другими препаратами или средствами (за исключением лечения цитокинами), такими, к примеру, как ретиноиды и/или анальгетики. Любые такие периоды лечения одним или несколькими препаратами или средствами в пределах одного цикла лечения могут полностью и/или частично перекрываться. Цикл лечения также может включать в себя один или несколько периодов времени без какого бы то ни было лечения. Периоды покоя, к примеру, могут составлять по меньшей мере 1 день или же 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 или 14 дней или больше. С другой стороны, периоды покоя, например, могут составлять не более 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 недели или меньше. Каждое лечение в цикле лечения предпочтительно может представлять собой лечение в соответствии с первым, вторым, третьим или каким-нибудь комбинированным аспектом, как это определено в кратком описании. Схема лечения по изобретению может включать в себя 1 или несколько циклов лечения, в частности, два или больше, либо 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или больше циклов лечения.

Термины "общее время лечения" или "весь период лечения" в настоящем изобретении означают непрерывный период лечения, включающий один или несколько следующих друг за другом циклов лечения. Цикл лечения может повторяться, в таком же либо в измененном виде, например, при другой дозе или по другой схеме, или же с одной или несколькими другими и/или дополнительными обработками (например, с одним или несколькими другими анальгетиками). Общее время лечения может составлять по меньшей мере 1 или 2 либо несколько циклов, например, вплоть до 10 или до 20 или даже больше циклов лечения. В одном воплощении общее время лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 циклов или больше. Как описано выше, циклы лечения могут включать периоды времени без лечения (интервалы, в которых пациенту не вводятся никакие средства, т.е. ни антитело, ни цитокин и никакой другой препарат). Так, в настоящем изобретении общее время лечения также может включать данные интервалы без лечения в пределах цикла лечения и/или между циклами лечения. В одном воплощении цикл лечения может следовать непосредственно после предыдущего цикла лечения, т.е. без перерыва между циклами лечения. Однако конец цикла лечения может включать и период времени лечения до начала следующего цикла лечения. Примеры общего времени лечения составляют, например, по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 месяцев или больше.

Если здесь приводится какой-либо диапазон, то любой такой диапазон должен включать в себя любой промежуток между границами диапазона (т.е. нижним и верхним пределом диапазона). Например, если приводится диапазон, например, от 1 до 5 дней, то это должно включать в себя 1, 2, 3, 4 и 5 дней. То

же самое относится и к любым другим диапазонам, включая без ограничения и другие периоды времени (например, время вливания в часах), любые диапазоны доз (например, на 1 м² площади поверхности тела, на 1 кг массы тела, в день, за 1 цикл лечения и т.д.), скорости вливания, концентрации, проценты, коэффициенты, соотношения и числа.

Антитело против GD2 или препарат антитела можно вводить нуждающимся в этом пациентам. В одном воплощении пациентом является больной GD2-положительным раком. GD2-положительный рак - такой тип рака, при котором на опухолевых клетках экспрессируется GD2. GD2-положительным раком является, к примеру, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, астроцитомы, меланома, мелкоклеточный рак легких, десмопластическая мелкокруглоклеточная фиброма, остеосаркома, рабдомиосаркома и/или другая саркома мягких тканей. В одном воплощении пациенту был поставлен диагноз нейробластомы, в частности, нейробластомы с высоким риском. В другом воплощении пациенту был поставлен диагноз нейробластомы 4-й стадии (в соответствии с международной системой классификации стадий нейробластомы (INSS)). В одном воплощении пациенту был поставлен диагноз минимальной остаточной болезни. В другом воплощении пациент диагностирован как полностью восприимчивый, т.е. пациент проявляет полную восприимчивость на лечение. В другом воплощении пациенту был поставлен диагноз рецидивирующей или рефрактерной болезни. В одном воплощении пациент страдает первичной рефрактерной или рецидивирующей нейробластомой с высоким риском или минимальной остаточной болезнью нейробластомы с высокой степенью риска. Пациент ранее мог подвергаться или может одновременно подвергаться одной или нескольким другим терапиям, таким, например, как хирургия, химиотерапия, лучевая, миелоаблативная терапия, сцинтиграфия с помощью метайодбензилгуанидина (mIBG), вакцинация, трансплантация стволовых клеток и/или лечение ретиноидами (например, изотретиноин).

В одном воплощении пациент не записан в клиническое испытание фазы I, II или III. В другом воплощении пациент не записан ни в каком клиническом испытании. В частности, пациент не записан ни в каком клиническом испытании ни в одной стране мира. Соответственно пациент не принимает участия ни в каком систематическом исследовании и/или официально поддерживаемом (например, любым компетентным национальным или региональным органом здравоохранения) тестировании в области медицинских исследований и разработки лекарственных средств, при котором генерируются данные по безопасности и эффективности какого-нибудь препарата или лечения. В одном воплощении пациент не принимает участия ни в каком систематическом исследовании и/или официально поддерживаемом (например, любым компетентным национальным или региональным органом здравоохранения) тестировании любых медицинских вмешательств (включая диагностики, устройства и т.д.). Прежние клинические испытания, описанные на предшествующем уровне техники с антителом против GD2 без сопутствующего приема IL-2 и/или любых других цитокинов, проводились для исследования общих эффектов, отрицательных эффектов и доз антитела в качестве основы для дальнейшего изучения. Однако на предшествующем уровне техники четко учат, что пациентов нужно лечить антителом против GD2 в комбинации по меньшей мере с одним цитокином, особенно IL-2. Соответственно любые применяемые в настоящее время схемы лечения антителом против GD2 включают по меньшей мере один цитокин, в частности, IL-2, а также в комбинации с GM-CSF (например, см. Yu et al., приведенная выше ссылка).

В одном из воплощений антитело против GD2 по изобретению специфически связывается с антигеном GD2. GD2 - дисialogанглиозид, который экспрессируется на опухолях нейроэктодермального происхождения. Антитело может быть выбрано из группы рекомбинантных или искусственных, в том числе одноцепочечных антител, антител млекопитающих, человеческих или гуманизованных антител. Оно может содержать или быть выбранным из константных и/или переменных областей антитела, в частности, из числа Fc, Fc-like, Fv, Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, scFv, scFc, VHH. Однако любые такие фрагменты антител должны тем самым опосредовать природные (или *in vivo*) эффекторные функции. Предпочтительно антитело содержит легкую и тяжелую цепь антитела. Антитело может содержать одну или две антигенсвязывающие области, которые могут связывать один и тот же или разные антигены, например, GD2, который может связываться специфически. Антитела по изобретению могут быть направлены - например, вырабатываться при иммунизации - против антигенов, приведенных выше. Антитело против GD2 может быть гуманизованным или химерным антителом против GD2, например гуманизованным или химерным антителом 14.18, 3F8 или 8B6, или мышинным антителом с такой же специфичностью, или же антигенсвязывающим фрагментом любого из них, который опосредует естественные эффекторные функции. В одном воплощении антитело не представлено антителом 14G2a. Антитело против GD2 может содержать одну или несколько аминокислотных модификаций, таких, например, как модифицированная Fc-область. В одном воплощении антитело против GD2 представлено hu14.18K322A. В другом воплощении антитело против GD2 представлено химерным антителом 14.18. В одном воплощении антитело против GD2 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты по SEQ ID NO: 1 и/или 2 и/или по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и/или 4 либо их фрагментов или гомологов. В одном воплощении антитело против GD2 кодируется по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и/или 4 либо их фрагментов или гомологов.

Термин "их фрагменты или гомологи" означает такие фрагменты или гомологи соответствующей последовательности, которые имеют такую же или близкую к нативной качественную активность. В одном

воплощении фрагменты или гомологи обладают по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% от исходной качественной активности. В одном воплощении фрагменты или гомологи по последовательности идентичны по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном воплощении антитело против GD2 имеет нуклеотидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1 (см. также пример 1) и нуклеотидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 2 (см. также пример 1). В одном воплощении антитело против GD2 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 3 (см. также пример 1) и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 4 (см. также пример 1). Относительная молекулярная масса антитела, состоящего из двух легких и двух тяжелых цепей, может составлять примерно 150000 дальтон. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, представлен APN311. В одном воплощении антитело против GD2 представлено динутуксимаб. Антитело против GD2 может экспрессироваться в клетках CHO, в клетках SP2/0 или в клетках других подходящих линий, таких, например, как HEK-293, MRC-5, Vero, PerC6 или NS0. В одном воплощении антитело против GD2 представлено антителом 14.18. В одном воплощении антитело против GD2 представлено химерным антителом 14.18, экспрессированным в клетках SP2/0 (ch14.18/SP2/0). В другом воплощении антитело против GD2 представлено химерным антителом 14.18, экспрессированным в клетках CHO (ch14.18/CHO). В одном воплощении антитело против GD2 может представлять собой фрагмент или гомолог антитела, кодируемого SEQ ID NO: 1, 2, 3 и/или 4, с такой же или близкой к нативной качественной активностью.

В некоторых воплощениях антитело против GD2 не слито с какой-либо другой молекулой. В некоторых воплощениях антитело против GD2 не является иммуноцитоклином. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, не содержит иммуноцитоклинов. В некоторых воплощениях пациент не получает одновременно иммуноцитоклины, в частности, не в пределах одного и того же цикла лечения и/или не во время всего периода лечения, включающего применение антитела.

Препарат, содержащий антитело против GD2, может дополнительно содержать соли и воду для инъекций (WFI), а также необязательно аминокислоты, в частности основные аминокислоты, такие, например, как гистидин, аргинин и/или лизин. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, может дополнительно содержать буфер, например, фосфатно-солевой буфер, содержащий указанные соли и WFI. Препарат, содержащий антитело против GD2, может дополнительно содержать стабилизирующие средства, консерванты и другие носители или наполнители. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, содержит антитело против GD2 (например, ch14.18) и дополнительно содержит сахарозу, полисорбат 20, гистидин и соляную кислоту. В одном воплощении антитело представлено ch14.18/CHO, а препарат, содержащий антитело, представлен APN311 (в измененном составе), причем данный препарат содержит 4,5 мг/мл антитела, 50 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 20 и 3,1 мг/мл гистидина. Препарат, содержащий антитело против GD2, может быть лиофилизирован. Восстановленный раствор может иметь pH 6±0,5. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, дополнительно содержит сахарозу, L-аргинин, моногидрат лимонной кислоты, полисорбат 20 и соляную кислоту. В одном воплощении данный препарат содержит 4 мг/мл антитела против GD2, 20 мг/мл сахарозы, 13,9 мг/мл L-аргинина, 2 мг/мл полисорбата 20 и 2,1 мг/мл моногидрата лимонной кислоты. В одном воплощении данный препарат лиофилизирован и может быть восстановлен в 4 мл 0,9% хлорида натрия, а полученный раствор имеет pH 5,5 (pH можно доводить соляной кислотой (HCl)). В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, не содержит стабилизирующих средств, консервантов и других наполнителей. Препарат, содержащий антитело против GD2, может быть добавлен в пакет для вливания, например, инфузионный мешочек, содержащий обычный физраствор, т.е. физиологический раствор NaCl (0,9%), необязательно с сывороточным альбумином человека (HAS, также именуется человеческим альбумином). В одном примере инфузионный мешочек содержит обычный физраствор и 0,25-5% сывороточного альбумина человека или же в любой промежуток между этими концентрациями. В одном примере инфузионный мешочек в конечном объеме содержит 250 мл 0,9% NaCl и 5 мл 20% альбумина человека или 100 мл 0,9% NaCl и 5 мл 20% альбумина человека или же 50 мл 0,9% NaCl и 2 мл 20% альбумина человека.

Антитело против GD2 или препарат, содержащий антитело против GD2, можно вводить в суточных дозах антитела от 1 до 30 мг/м², от 1 до 35 мг/м², от 1 до 50 мг/м² или от 1 до 60 мг/м², например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 50 или 60 мг/м² или же в любом промежутке между этими дозами. В одном воплощении антитело против GD2 или препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточных дозах антитела 7, 7,5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25, 30, 32 или 35 мг/м² или же в любом промежутке между этими дозами. Например, суточная доза в 10 мг/м² означает, что пациент получает 10 мг антитела против GD2 на 1 м² поверхности тела в сутки. В настоящем изобретении доза (например, приведенная в мг или мкг) относится к дозе активного ингредиента, т.е. количеству активного ингредиента в препарате. Например, данная доза может относиться к количеству антитела против GD2 в препарате, содержащем антитело против GD2, или цитокина в препарате, содержащем цитокин, или же морфина, или другого анальгетика в препарате, содержащем морфин или другой анальгетик, и т.д. Как указано в приведенном выше примере, суточная доза в 10 мг/м² означает, что пациент получает 10 мг антитела против GD2 (которое необязательно содержится

в определенном объеме препарата, содержащего антитело против GD2) на 1 м^2 поверхности тела в сутки. В настоящем изобретении доза, приведенная на 1 м^2 , означает на 1 м^2 площади поверхности тела (BSA) пациента. В настоящем изобретении доза, приведенная на 1 кг, означает на 1 кг массы тела пациента.

В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточных дозах от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25, от 1 до 30 или от 1 до 35 $\text{мг}/\text{м}^2$ или же в любом промежутке между этими суточными дозами. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточных дозах менее 50,0, 30 или 25 $\text{мг}/\text{м}^2$. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточных дозах до 7, 10, 15, 17,5 или 20 $\text{мг}/\text{м}^2$. В одном воплощении препарат антитела вводится в дозе 15, 17,5, 20 или 25 $\text{мг}/\text{м}^2/\text{день}$ в течение 4-х дней. В одном воплощении препарат антитела вводится в дозе 50 $\text{мг}/\text{м}^2/\text{день}$ в течение 4-х дней. Антитело против GD2 можно вводить в дозе 10, 20, 25, 50, 60, 65, 68, 70, 75, 80, 100, 120, 150, 200, 210, 250 или 300 $\text{мг}/\text{м}^2/\text{цикл}$ или же в любом промежутке между этими дозами. Общая доза на 1 пациента за 1 цикл лечения может определяться как заданная общая доза для пациента.

В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде внутривенного вливания на протяжении 5 ч или более в день, например, 5,75 ч или более в день, 8 ч или более в день, 10 ч или более в день либо до 20 ч в день или до 24 ч в сутки или же в любом промежутке между этими периодами времени, например, на протяжении 4 или 5 дней или больше. В других воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания на протяжении 24 ч в сутки. В некоторых воплощениях антитело против GD2 вводится в виде непрерывного внутривенного вливания на протяжении 24 ч в сутки до тех пор, пока не будет введена заданная общая доза для пациента. В некоторых воплощениях антитело против GD2 вводится в виде непрерывного внутривенного вливания на протяжении 24 ч в сутки в течение одного или нескольких дней, например, в течение 4, 5, 10, 14, 15 или вплоть до 21 или больше дней.

В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в течение всего периода лечения до достижения определенного терапевтического эффекта. В некоторых воплощениях терапевтический эффект может заключаться в усилении иммунного ответа на опухоль, что определяется, к примеру, по возрастанию биомаркеров иммунной системы (например, таких параметров крови, как число лимфоцитов и/или число NK-клеток; и/или цитокинов). В некоторых воплощениях терапевтический эффект может заключаться в уменьшении опухолевых маркеров (например, катехоламинов). В некоторых воплощениях терапевтический эффект может определяться такими методами, как сцинтиграфия с помощью метайодбензилгуанидина (mIBG), магнитно-резонансная томография (MRI) или рентгеновская компьютерная томография (СТ) и/или гистология костного мозга (при исследовании аспирата или трепанобиопсии) и/или анализы CDC и/или WBTs.

В некоторых воплощениях терапевтический эффект может определяться как стабильное состояние (т.е. нет дальнейшего увеличения поражений, опухолевой ткани и/или размера), частичная реакция (т.е. уменьшение поражений, опухолевой ткани и/или размера) и/или полная реакция (т.е. полная ремиссия всех поражений и опухолевой ткани).

Полная реакция (CR) может дополнительно определяться следующим образом:

полное исчезновение всех измеримых и поддающихся оценке очагов заболевания;

отсутствие новых очагов поражения;

отсутствие симптомов заболевания; и/или

отсутствие поддающихся оценке признаков заболевания, включая, например, нормализацию маркеров и/или других аномальных лабораторных показателей.

В некоторых воплощениях все измеримые, поддающиеся оценке и не поддающиеся оценке очаги и места поражения должны оцениваться по той же методике, что и исходно. Частичная реакция (CR) может дополнительно определяться следующим образом:

применимо только к пациентам по меньшей мере с одним измеримым очагом поражения;

уменьшение больше чем или на 50% от исходного суммы произведений перпендикулярных диаметров всех измеримых очагов поражения;

отсутствие прогрессирования данного заболевания;

отсутствие новых очагов поражения.

В некоторых воплощениях все измеримые, поддающиеся оценке и не поддающиеся оценке очаги и места поражения должны оцениваться по той же методике, что и исходно.

Препарат, содержащий антитело против GD2, можно вводить так, как описано в PCT/EP2012/061618 или PCT/EP2012/064970. Например, препарат, содержащий антитело против GD2, можно вводить в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 24 ч в сутки. Соответственно в одном из аспектов изобретения касается препаратов, содержащих антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациентов, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней и в течение одного, двух или больше циклов лечения, без одновременного введения IL-2. В другом аспекте изобретения касается препаратов, содержащих антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациентов, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится паци-

енту в виде непрерывного вливания без одновременного введения IL-2, и при этом антитело против GD2 не представлено антителом 14G2a или же при этом антитело против GD2 представлено химерным или гуманизованным антителом против GD2.

Препарат, содержащий антитело против GD2, можно вводить в течение 4, 5, 10, 14, 15 или 21 последовательных дней или в любом промежутке между этими периодами. Препарат, содержащий антитело против GD2, также можно вводить в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более дней подряд. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится на протяжении всего цикла лечения, например, в течение 35 дней. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания в течение всего времени лечения, например, на протяжении 5 циклов лечения по 35 дней каждый, т.е. в общей сложности на протяжении 180 дней. Суточную дозу антитела можно соответственно уменьшить с тем, чтобы пациенту вводилась заданная доза антитела. В одном воплощении заданная доза антитела составляет 100 мг/м²/цикл. В одном воплощении общее время лечения составляет 5 циклов. Соответственно в этом примере доза антитела за общее время лечения составляет 500 мг/м². В одном воплощении эта общая доза антитела в 500 мг/м² за общее время лечения вводится на протяжении 180 дней, т.е. по 2,77 мг/м²/день. Препарат, содержащий антитело против GD2, можно вводить в виде непрерывного внутривенного вливания в течение периода времени по 24 ч в сутки. Для такого непрерывного вливания можно использовать осмотический мининасос. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 24 ч в сутки на протяжении 4, 5, 10, 14, 15 или 21 последовательных дней или в любом промежутке между этими периодами, в указанных выше суточных дозах (например, 7, 10, 15, 17,5, 20 или 25 мг/м²/день), например 15, 17,5, 20 или 25 мг/м²/день в течение 4 дней, 20 мг/м²/день в течение 5 дней, 10 мг/м²/день в течение 10 дней, 15 мг/м²/день в течение 10 дней, 7 мг/м²/день в течение 14 дней, 15 мг/м²/день в течение 14 дней, 10 мг/м²/день в течение 15 дней, 7 мг/м²/день в течение 21 дня или 10 мг/м²/день в течение 21 дня или в любом промежутке между этими дозами. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится не в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 5 дней в суточной дозе 40 мг/м². В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится не в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 5 дней, т.е. не в виде 120-часового вливания. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания в течение более 5 дней. В некоторых воплощениях препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 6 или более дней.

В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, представлен APN311 и вводится в дозе 10 мг/м²/день в течение 10 дней. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, представлен APN311 и вводится в дозе 10 мг/м²/день в течение 10 последовательных дней на протяжении 1, 2, 3, 4, 5 или 6 и более циклов лечения.

В соответствии с настоящим изобретением, пациент не получает одновременно IL-2. В некоторых воплощениях пациент не получает одновременно ни IL-2, ни GM-CSF. В некоторых воплощениях пациент не получает одновременно никаких цитокинов. Соответственно термин "пациент не получает одновременно IL-2, GM-CSF и/или других цитокинов" включает соответствующие схемы лечения, описанные выше, т.е. без IL-2, без IL-2 и без GM-CSF и/или без каких-либо цитокинов. В одном воплощении пациента не получает одновременно IL-2, GM-CSF и/или других цитокинов в пределах одного и того же цикла лечения. В одном воплощении пациента не получает одновременно IL-2, GM-CSF и/или других цитокинов в пределах одного и того же общего времени лечения. В некоторых воплощениях пациент мог получать IL-2, GM-CSF и/или один или несколько других цитокинов в одном или нескольких предыдущих циклах лечения и/или во все время лечения. В некоторых воплощениях пациент не получал IL-2, GM-CSF и/или один или несколько других цитокинов в одном или нескольких предыдущих циклах лечения и/или во все время лечения. В одном воплощении периоде лечения антителом не предшествует, не сопровождает его и/или не следует за ним один или несколько периодов приема IL-2, GM-CSF и/или одного или нескольких других цитокинов, т.е. препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2, GM-CSF и/или одного или нескольких других цитокинов. В одном воплощении период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, не сопровождается одним или несколькими периодами приема цитокинов (или препаратов, содержащих один или несколько цитокинов), в частности, не в пределах одного и того же цикла лечения и/или не в пределах одного и того же общего времени лечения (включая введение антитела). Например, пациент не получает одновременно колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), GM-CSF, IL-2, IL-12 и/или IL-15. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения GM-CSF. В одном воплощении пациенту не вводится IL-2 и/или GM-CSF (либо препарат, содержащий IL-2 и/или GM-CSF) в пределах одного и того же цикла лечения, который включает период введения антитела. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2 и/или GM-CSF. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения цитокина.

Периоду лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, может предшествовать, сопровождать его и/или следовать за ним один или несколько периодов лечения ретиноидом (или препаратом, содержащим ретиноид). В одном воплощении за одним или несколькими периодами лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, следует один или несколько периодов лечения ретиноидом. Один или несколько периодов приема ретиноида могут следовать в пределах одного и того же или нескольких циклов лечения, включающих один или несколько периодов введения антитела, или же после этого, т.е. по окончании одного или нескольких циклов лечения, включающих один или несколько периодов введения антитела, в частности, по окончании последнего цикла лечения, включающего один или несколько периодов введения антитела, т.е. по окончании общего времени лечения антителом. Соответственно в одном воплощении существует период времени между периодом введения антитела и периодом введения ретиноида, который может быть периодом времени без лечения или же может включать в себя один или несколько периодов введения одного или нескольких других препаратов или средств.

В одном воплощении за одним или несколькими периодами лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, следует один или несколько периодов лечения ретиноидом в пределах одного и того же цикла лечения. В одном воплощении цикл лечения включает по меньшей мере один период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, и по меньшей мере один период лечения ретиноидом. В одном воплощении цикл лечения может дополнительно включать один или несколько периодов отсутствия лечения. В одном воплощении цикл лечения включает по меньшей мере один период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, за которым следует по меньшей мере один период лечения ретиноидом. В одном воплощении цикл лечения может включать по меньшей мере один период отсутствия лечения между по меньшей мере одним периодом лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, и по меньшей мере одним периодом лечения ретиноидом.

В одном воплощении ретиноид представляет собой ретиноевую кислоту (RA), например, изотретиноин (цис-RA). Ретиноид может представлять собой ретиноид первого поколения (например, ретинол, ретиналь, третиноин (ретиноевая кислота, ретин-А), изотретиноин или алитретиноин), ретиноид второго поколения (например, этретинат или его метаболит ацитретин) и/или ретиноид третьего поколения (например, тазаротен, бексаротен или адапален). Ретиноид также может быть производным ретиноида, в частности, синтетическим производным ретиноида, таким, например, как фенретинид. Перед или после одного или нескольких периодов лечения ретиноидом может быть период лечения без введения антитела и/или IL-2 (или другого цитокина).

Любой такой период лечения может быть повторен. За любым таким периодом лечения может следовать промежуток без лечения таким же и/или другим препаратом или средством. В одном воплощении этот промежуток может быть свободным от какого-либо лечения. В другом воплощении этот промежуток свободен от введения того же самого препарата или средства, однако в этом промежутке могут вводиться другие препараты или средства.

Кроме того, лечению по настоящему изобретению может предшествовать и/или сопровождаться приемом одного или нескольких анальгетиков (либо препарата, содержащего один или несколько анальгетиков), таких, например, как нестероидные противовоспалительные средства (NSAID, например, индометацин), и/или одного или нескольких опиоидов и/или одного или нескольких других анальгетиков либо их комбинаций. В одном воплощении анальгетиком служит опиоид, например, морфин и/или производные морфина, такие, например, как гидроморфон. Другие опиоиды - это, к примеру, трамадол, пентидин, кодеин, пиритрамид, левометадон, а также фентанил, алфентанил, ремифентанил и суфентанил.

Как описано выше, антитело против GD2, как правило, вводилось пациентам в комбинации с одним или несколькими цитокинами (в обычных дозах), особенно IL-2 и/или GM-CSF. Однако комбинация введения антитела с обычным приемом цитокинов усиливает побочные эффекты применения антител, в частности, боли. Таким образом, требовалось применение одного или нескольких анальгетиков, особенно морфина. А теперь неожиданно оказалось, что лечение антителом против GD2 эффективно даже без приема цитокинов. Соответственно при полном устранении приема цитокинов может значительно уменьшиться побочный эффект боли (и другие побочные эффекты), поэтому можно уменьшить и введение морфина и/или других анальгетиков. С помощью препаратов и способов по изобретению можно уменьшить дозу, изменить способ введения (например, из внутривенного вливания на прием внутрь), сократить продолжительность периода применения анальгетиков и/или сменить тип препарата одного или нескольких анальгетиков. Таким образом, настоящее изобретение даже позволяет амбулаторное лечение, по крайней мере для части цикла лечения, пациентов, получающих препараты, содержащие антитело против GD2.

В одном воплощении, при схеме введения по изобретению, т.е. введения антитела против GD2 без одновременного введения IL-2, GM-CSF и/или другого цитокина, побочные эффекты значительно снижаются по сравнению со схемой лечения, включающей одновременное применение IL-2, GM-CSF и/или одного или нескольких других цитокинов. В другом воплощении существенно снижается побочный эффект боли по сравнению со схемой лечения, включающей одновременное применение IL-2, GM-CSF и/или одного или нескольких других цитокинов.

Соответственно в одном воплощении уменьшается доза одного или нескольких анальгетиков, осо-

бенно морфина, в пределах общего времени лечения, в рамках одного цикла лечения, в период введения антитела в одном цикле лечения, от одного дня введения антитела до следующего дня введения антитела в одном цикле лечения и/или от одного цикла лечения к следующему.

Дозы анальгетиков можно еще больше уменьшить при долгосрочном вливании антитела против GD2, например, в виде непрерывного в/в вливания в течение 24 ч в сутки, как это описано в PCT/EP2012/061618 и PCT/EP2012/064970 и описано здесь. Таким образом, доза анальгетиков может существенно уменьшиться при схеме лечения по изобретению без IL-2, а в некоторых воплощениях также без GM-CSF, а в некоторых воплощениях и без каких-либо других цитокинов, в сочетании с непрерывным вливанием антитела. Термин "без других цитокинов" или "без каких-либо цитокинов" в настоящем изобретении означает, что не используется ни IL-2, ни GM-CSF, а также никакие другие цитокины, т.е. цитокины не используются вообще при соответствующей схеме лечения и/или в течение определенного времени лечения, например, в пределах одного и того же цикла лечения и/или в течение того же общего времени лечения. Соответственно в некоторых воплощениях не используется IL-2. В некоторых воплощениях не используется ни IL-2, ни GM-CSF. В некоторых воплощениях не используются никакие цитокины. Таким образом, термин "без IL-2, а в некоторых воплощениях и без GM-CSF, а в некоторых воплощениях и без других цитокинов" означает соответствующие воплощения, как описано выше, а именно лечение (например, периоды лечения, циклы лечения и/или общее время лечения) без IL-2, без IL-2 и без GM-CSF и/или без каких-либо цитокинов.

Один или несколько анальгетиков могут вводиться перорально. Один или несколько анальгетиков также могут вводиться в виде внутривенного вливания, особенно в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 24 ч в сутки. Период применения одного или нескольких анальгетиков может предшествовать и/или сопровождать период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2.

В некоторых воплощениях один или несколько анальгетиков могут быть выбраны из аналогов ГАМК, таких, например, как габапентин. Соответственно пациент может принимать габапентин, например, за три дня до начала периода введения антитела.

Следующие дозы и примеры применения анальгетиков являются обычными дозами, которые можно снижать, как описано здесь. Как правило, при этом габапентин вводится перорально в дозе 10 мг/кг один, два или три раза в день. Габапентин можно вводить в дозе вплоть до 300 мг/кг. Габапентин доступен и может вводиться в виде перорального раствора, содержащего 250 мг/5 мл габапентина, или в капсулах (100 мг, 300 мг и 400 мг). Применение габапентина может проводиться вместо или в дополнение к применению морфина и/или других анальгетиков. Кроме того, пациенты могут получать парацетамол (в дозе от 10 до 15 мг/кг через каждые 4 ч или четыре раза в день, перорально или внутривенно), ибупрофен (в дозе от 5 до 10 мг/кг перорально через каждые 6-12 ч), метамизол (в дозе от 10 до 15 мг/кг перорально через каждые 4 ч), дифенгидрамин (в дозе от 0,5 до 1 мг/кг перорально или внутривенно) и/или индометацин (например, в дозе от 0,3 до 0,5 мг/кг либо по 25 или 50 мг, перорально или внутривенно через каждые 6 ч). Такое применение парацетамола, ибупрофена, метамизола и/или индометацина может проводиться вместо или в дополнение к применению морфина и/или габапентина и/или других анальгетиков.

В некоторых воплощениях в качестве анальгетика применяется морфин, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими анальгетиками. В качестве примера в табл. 1 приведены некоторые обычные дозы морфина, которые вводятся до и/или во время периода лечения препаратом, содержащим антитело против GD2. В этом примере обычных доз ch14.18/CHO (APN311) вводится в виде вливания 8 ч в день на протяжении 5 дней в дозе 20 мг/м²/день, т.е. 100 мг/м²/цикл, IL-2 вводится п/к по 6 мМЕ/м²/день на протяжении 5 дней по два раза за цикл (т.е. 60 мМЕ/м²/цикл), в течение 5 циклов, а морфин гидрохлорид вводится каждый день при введении антитела (т.е. каждый день в цикле лечения, когда пациенту вводят препарат, содержащий антитело против GD2) болюсом в дозе 0,05 мг/кг/ч в течение 2 ч до начала вливания APN311, со скоростью вливания 0,03 мг/кг/ч в течение 8 ч во время вливания APN311, а в промежутке со скоростью вливания 0,01 мг/кг/ч в течение 14 ч в первый день лечения с APN311 и по 4 ч в последующие дни лечения, при хорошей переносимости (с интервалом в 10 ч без введения морфина). Доза повышается (например, повышается скорость вливания во время вливания антитела) и/или вводятся дополнительные дозы болюсом по мере необходимости. Соответственно назначаемая доза морфина составляет по меньшей мере 0,38 мг/кг в день, по меньшей мере 2 мг/кг за один цикл лечения (включающий 5 дней введения антитела) и по меньшей мере 10 мг/кг за все время лечения (включающее три цикла).

Таблица 1

Схема вливания морфина

	Продолжительность вливания морфина (ч)	Скорость вливания морфина (мг/кг/ч)	Доза морфина (мг/кг)
Предвар. вливание	2	0,05	0,1
Вливание во время введения APN311	8	0,03	0,24
Промежут. вливание	14 или 4	0,01	0,14 или 0,04
Общая доза за 1 день лечения (мг/кг/24ч)			0,48 или 0,38

Приготовить раствор 10 мг морфина в 40 мл 5% глюкозы (0,25 мг в 1 мл).

В другом примере обычных доз APN311 вводится в виде вливания 8 ч в день на протяжении 5 дней в течение 3 циклов в дозе 10, 20 или 30 мг/м²/день, т.е. 50, 100, 150 мг/м²/цикл. IL-2 вводится п/к по 6 мМЕ/м²/день на протяжении 5 дней по два раза за цикл (т.е. 60 мМЕ/м²/цикл), а морфин гидрохлорид вводится каждый день при введении антитела болюсом в дозе 0,5-1,0 мг/кг (перед самым началом вливания антитела) и в виде непрерывного вливания со скоростью 0,05 мг/кг/ч во время вливания APN311. Доза повышается (например, повышается скорость вливания во время вливания антитела) и/или вводятся дополнительные дозы болюсом по мере необходимости. Соответственно назначаемая доза морфина (или обычная доза морфина) составляет по меньшей мере 0,9 мг/кг в день, по меньшей мере 4,5 мг/кг за один цикл лечения (включающий 5 дней введения антитела) и по меньшей мере 13,5 мг/кг за все время лечения (включающее три цикла).

В других примерах обычного лечения с помощью ch14.18 и одного или нескольких цитокинов морфин вводится вливанием со скоростью до 1,2 мг/кг/ч на протяжении 24 ч.

В еще одном примере обычных доз ch14.18/Sp2/0 вводится в дозе 25 мг/м²/день на протяжении 4 дней. В одном воплощении каждая доза ch14.18/Sp2/0 вводится вливанием в/в на протяжении 5,75 или больше (может быть увеличено до 20 ч) либо 10 или больше часов (может быть увеличено до 20 ч), начиная с 1,25 мг/м²/ч×0,5 ч, затем 2,5 мг/м²/ч×0,5 ч, и необязательно с дальнейшим повышением скорости вливания до 3,75 мг/м²/ч×0,5 ч, а затем до 5 мг/м²/ч для оставшейся дозы при хорошей переносимости. IL-2 вводится каждый второй цикл (например, циклы 2 и 4) в виде непрерывного в/в вливания на протяжении 4 дней (96 ч) по 3 мМЕ/м²/день в 1-ю неделю цикла лечения и по 4,5 мМЕ/м²/день во 2-ю неделю цикла лечения (т.е. 30 мМЕ/м²/цикл). GM-CSF вводится п/к. в суточной дозе 250 мкг/м². В одном воплощении каждый цикл лечения начинается в день 0, причем день 0 цикла лечения является первым днем применения соответствующего цитокина. Общее время лечения может включать в себя 1, 2, 3, 4 или 5 и больше циклов лечения. В табл. 2, 3 и 4 представлены примеры обычных схем лечения.

Таблица 2

Схема обычного введения из 5 циклов для ch14.18/Sp2/0, цитокинов и изотретиноина (ретиноевая кислота или RA)

Цикл 1	Цикл 2	Цикл 3	Цикл 4	Цикл 5
ch14.18	ch14.18	ch14.18	ch14.18	ch14.18
GM-CSF	алдезлейкин (IL-2)	GM-CSF	алдезлейкин (IL-2)	GM-CSF
RA	RA	RA	RA	RA

В данном примере обычных доз введение ch14.18/SP2/0 проводится через каждые 28 дней по 25 мг/м²/день×4 дня для всех 5 циклов; GM-CSF по 250 мкг/м²/день в течение 14 дней; алдезлейкин (IL-2) по 3 мМЕ/м²/день в течение 1-й недели и по 4,5 мМЕ/м²/день в течение 2-й недели.

Таблица 3

Схема циклов лечения с GM-CSF

День	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14-23	24
GM-CSF	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	x		сначала
ch14.18				↑	↑	↑	↑									циклы 2 и 4
RA											↑	↑	↑	↑	↑	

Примечание.

В отличие от приведенной выше схемы лечения, введение RA начинается на 11-й день первого цикла, но в соответствии со схемой на 10-й день третьего и пятого цикла. Соответственно в отличие от приведенной выше схемы лечения, 24-й день первого цикла лечения также является последним днем введения RA в первом цикле.

В данном примере обычных доз GM-CSF вводится по 250 мкг/м²/день в виде подкожной инъекции (настоятельно рекомендуется) или в виде в/в вливания по 2 ч в день с дня 0 по 13-й день (ежедневно при вливании ch14.18/SP2/0 и в течение 3 дней до и 7 дней после введения антитела).

Таблица 4

Схема циклов лечения с алдзлейкином (IL-2)

День	0	1	2	3	4-6	7	8	9	10	11-13	14	15	16	17	18-27
IL-2	x	x	x	x		x	x	x	x						
ch14.18						↑	↑	↑	↑						
RA											↑	↑	↑	↑	↑

С 28 по 31-й день циклов с алдзлейкином обработка не проводится. На 32-й день начинается следующая цикл лечения (с GM-CSF) (день 32=день 0 следующего цикла).

В качестве примера обычных доз можно вводить алдзлейкин (интерлейкин-2, IL-2) в дозе 3 мМЕ/м²/день путем непрерывного вливания (с помощью амбулаторного инфузионного насоса CADD® или аналогичного инфузионного насоса) в течение 4 дней (дни 0-3) в первую неделю каждого цикла. Во вторую неделю каждого цикла алдзлейкин (IL-2) можно вводить по 4,5 мМЕ/м²/день в течение 4 дней (дни 7-10, при вливании ch14.18/SP2/0). Алдзлейкин можно непрерывно вливать в/в на протяжении 96 ч через катетер с помощью амбулаторного инфузионного насоса в 5%-ном растворе декстрозы в воде (может содержать 0,1% сывороточного альбумина человека, если нужно), а общий объем зависит от насоса.

Может быть добавлен шестой цикл лечения из 14 дней без лечения (начиная с 24-го дня пятого цикла, который будет днем 0 шестого цикла), а после них 14 дней с введением только изотретиноина.

В одном примере обычных доз в этих условиях (т.е. при тех процедурах, что описаны выше), гидроксизин (1 мг/кг; макс, доза 50 мг) или дифенгидрамин (0,5-1,0 мг/кг; макс, доза 50 мг) вводится в/в на протяжении 10 мин, начиная за 20 мин до вливания ch14.18/SP2/0; ацетаминофен (10 мг/кг; макс, доза 650 мг) вводится п/о за 20 мин до вливания ch14.18/SP2/0; и/или морфин сульфат вводится в ударной дозе 50 мкг/кг непосредственно перед введением ch14.18/SP2/0, а затем продолжается через капельницу со скоростью инфузии 20-50 мкг/кг/ч еще в течение 2 ч по завершении вливания ch14.18/SP2/0. Кроме того, можно использовать и другие наркотические средства, как-то гидроморфон или фентанил. С другой стороны, можно использовать вливание лидокаина в сочетании с в/в болюсом морфина, если нужно. Рекомендации по введению лидокаина при вливании приводятся ниже.

Введение лидокаина (в обычных дозах):

а) вводить лидокаин в/в болюсом по 2 мг/кг в 50 см³ стандартного физраствора (NS) на протяжении 30 мин до начала вливания ch14.18/SP2/0;

б) в начале вливания ch14.18/SP2/0 начинать в/в вливание лидокаина в дозе 1 мг/кг/ч и продолжать еще 2 ч по завершении вливания ch14.18/SP2/0;

с) можно вводить морфин в/в болюсом по 25-50 мкг/кг каждые 2 ч, если нужно.

В данном примере обычных доз также можно рассмотреть введение габапентина с ударными дозами морфина и вводить морфин вливанием/болюсом по необходимости; можно начинать с 10 мг/кг/день габапентина и титровать вплоть до 30-60 мг/кг/день в зависимости от клинической реакции.

В данном примере обычных доз введение гидроксизина (или дифенгидрамина) и ацетаминофена можно повторять каждые 6 ч, если нужно; в/в или per os.

В данном примере обычных доз можно вводить дополнительные дозы морфина во время вливания ch14.18/SP2/0 для лечения нейропатической боли с последующим увеличением скорости вливания морфина сульфата, но нужно тщательно следить за пациентами. Если пациенты не переносят морфина (например, зуд), то морфин можно заменить на фентанил или гидроморфон. С другой стороны, в сочетании с в/в болюсом морфина можно использовать вливание лидокаина при необходимости.

Термин "доза морфина" в настоящем изобретении означает количество морфина (в мг или мкг) на кг массы тела пациента. Соответственно, если это относится к суточной дозе морфина, то это означает количество морфина (в мг или мкг) на кг массы тела пациента в день, а если это относится к дозе морфина в час, то это означает количество морфина (в мг или мкг) на кг массы тела пациента в час (или скорость вливания морфина), а если это относится к дозе морфина за цикл лечения, то это означает количество морфина (в мг или мкг) на кг массы тела пациента на цикл лечения, а если же это относится к дозе морфина за все время лечения, то это означает количество морфина (в мг или мкг) на кг массы тела пациента за все время лечения.

В некоторых воплощениях морфин и/или другие анальгетики могут вводиться в обычной суточной дозе, но со снижением частоты введения, например, только через день, если раньше его вводили каждый день. В другом примере, в котором морфин и/или другие анальгетики обычно вводились в виде непрерывного в/в вливания на протяжении нескольких дней, можно уменьшить либо время вливания за день (получая прерывистое вливание), либо общую продолжительность непрерывного вливания, т.е. количество дней непрерывного вливания.

В некоторых воплощениях суточная доза одного или нескольких анальгетиков в один или несколько дней при введении антитела (т.е. те дни цикла лечения, в которые пациенту вводится препарат, содержащий антитело против GD2) в цикле лечения по изобретению (без IL-2, а в некоторых воплощениях без IL-2 и без GM-CSF, а в некоторых воплощениях вообще без обработки цитокином) будет ниже, чем обычная суточная доза, вводимая в один или несколько дней при введении антитела в обычном цикле лечения (с обычной обработкой цитокином).

В некоторых воплощениях доза (например, суточная доза) одного или нескольких анальгетиков (например, морфина) снижается с течением времени, например, в пределах общего времени лечения, в рамках одного цикла лечения, в период введения антитела в одном цикле лечения, от одного дня введения антитела или анальгетика до следующего дня введения антитела или анальгетика в одном цикле лечения и/или от одного цикла лечения к следующему. В некоторых воплощениях доза анальгетика, в частности, доза морфина, непрерывно снижается в пределах одного цикла лечения, в период введения антитела в одном цикле лечения и/или от одного дня введения антитела или анальгетика/морфина до следующего дня введения антитела или анальгетика/морфина в пределах одного цикла лечения.

В некоторых воплощениях суточная доза морфина, вводимая в течение одного или нескольких дней введения антитела по схеме вливания без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF (и без IL-2), а в некоторых воплощениях и без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением, и/или доза морфина во все дни введения антитела или морфина будет ниже, чем суточная доза морфина при введении антитела с обычными дозами одного или нескольких цитокинов. В некоторых воплощениях суточная доза морфина или доза морфина за один цикл, вводимая по схеме вливания антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо цитокинов, составляет 90% или меньше, 80% или меньше, 70% или меньше, 60% или меньше, или 50% или меньше, или 40% или меньше, или 30% или меньше, или 20% или меньше, или 10% или меньше дозы морфина, вводимой или назначаемой по схеме вливания антитела с обычными дозами цитокинов. В некоторых воплощениях суточная доза морфина, вводимая в течение одного или нескольких дней непрерывного внутривенного вливания антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях также без GM-CSF, а в некоторых воплощениях также без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением, и/или во все дни введения антитела или морфина составляет менее 0,9, 0,72, 0,48, 0,38, 0,4375 и/или 0,205 мг/кг/день.

В некоторых воплощениях морфин вводится только в некоторые, но не во все дни, в которые вводится антитело, например только в первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней введения антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов. В некоторых воплощениях морфин не вводится в один или несколько дней при ведении антител или даже в пределах всего цикла лечения. В некоторых воплощениях морфин вводится только в некоторые, но не во всех циклах лечения.

В некоторых воплощениях скорость вливания морфина, т.е. количество морфина на кг массы тела пациента (или доза морфина) в час, вводимое в течение одного или нескольких часов или дней при внутривенном вливании антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением и/или во все часы или дни введения морфина будет ниже, чем стандартная скорость вливания морфина, предписанная по схеме с обычными дозами цитокина, и/или ниже, чем скорость вливания морфина в примерах с обычными дозами цитокинов, описанными выше. В некоторых воплощениях скорость вливания морфина, вводимого в течение одного или нескольких дней при внутривенном вливании антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением, и/или во все дни введения антитела или морфина составляет менее 50, 40, 30, 20, 10 и/или 5 мкг/кг/ч и/или меньше, чем в любом промежутке между этими скоростями вливания. В некоторых воплощениях скорость вливания морфина, вводимого в течение одного или нескольких дней при внутривенном вливании антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением и/или во все дни введения антитела или морфина составляет менее 50 мкг/кг/ч в первом и необязательно в следующих циклах лечения, менее 40 мкг/кг/ч во втором и необязательно в следующих циклах лечения, менее 30 мкг/кг/ч в третьем и необязательно в следующих циклах лечения, менее 20 мкг/кг/ч в четвертом и необязательно в следующих циклах лечения и/или менее 10 мкг/кг/ч в пятом и необязательно в следующих циклах лечения.

В некоторых воплощениях доза морфина на один цикл лечения, вводимая в течение одного или нескольких циклов лечения, включающих внутривенное вливание антитела без IL-2, в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением будет ниже, чем доза морфина на один цикл лечения по схеме вливания с обычным введением цитокина, например 90, 80, 70% или меньше в первом цикле лечения; 80, 70, 60% или меньше во втором цикле лечения; 60, 50, 40% или меньше в третьем цикле лечения; 45, 35, 25% или меньше в четвертом цикле лечения; и/или 30%, 20%, 10% или меньше в пятом цикле лечения. В некоторых воплощениях доза морфина на один цикл лечения во втором и следующих циклах лечения, вводимая в течение одного или нескольких циклов лечения, включающих внутривенное вливание антитела без IL-2, в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением будет ниже, чем доза морфина на один цикл лечения по схеме вливания антитела с обычными дозами цитокинов. В некоторых воплощениях доза морфина в данном цикле лечения и в следующих циклах лечения и/или за все время лечения будет ниже, чем доза морфина на один цикл лечения по обычной схеме вливания. В некоторых воплощениях доза морфина на один цикл лечения, вводимая в течение одного или нескольких циклов лечения, включающих внутривенное вливание антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других

цитокинов в соответствии с изобретением составляет менее 7,2, 4,8, 4,5, 2, 1,75 и/или 0,82 мг/кг/цикл или меньше, чем в любом промежутке между этими дозами.

В некоторых воплощениях доза морфина за все время лечения по схеме вливания согласно изобретению (т.е. при внутривенном вливании антитела без IL-2, в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо других цитокинов в соответствии с изобретением) будет ниже, чем доза морфина за все время лечения по обычной схеме вливания (т.е. по схеме вливания антитела с обычными дозами цитокинов). В одном воплощении доза морфина за все время лечения по схеме вливания согласно изобретению составляет 90% или меньше, 80% или меньше, 70% или меньше, 60% или меньше или 50% или меньше, 40% или меньше, 30% или меньше, 20% или меньше, 10% или меньше дозы морфина за все время лечения по обычной схеме вливания и/или меньше, чем в любом промежутке между этими дозами. В некоторых воплощениях доза морфина за все время лечения по схеме вливания согласно изобретению без введения цитокинов составляет менее 43,2, 28,8, 13,5, 10, 8,75 и/или 4,1 мг/кг на все время лечения и/или меньше, чем в любом промежутке между этими дозами.

В некоторых воплощениях стандартные дозы морфина при обычных схемах вливания, приводимые здесь по сравнению с дозами морфина при схемах вливания по настоящему изобретению, относятся к стандартным дозам морфина для данной схемы или к дозам морфина, предписанным для данной схемы (например, приведенным в протоколах клинических исследований). В некоторых воплощениях стандартные дозы морфина, приводимые здесь, относятся к дозе морфина, которая вводится в первый день лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, в цикле лечения по схеме вливания антитела согласно изобретению и/или по обычной схеме и именуется "начальная доза морфина".

Соответственно термин "стандартная доза морфина" в настоящем изобретении охватывает и дозы морфина по другим схемам лечения, чем по настоящему изобретению (например, с введением цитокинов), и/или начальные дозы морфина (например, по схемам лечения с введением цитокинов или без него); и охватывает все примеры таких доз морфина, приведенные здесь в сравнении с другими дозами морфина при схемах вливания антитела без IL-2, а в некоторых воплощениях без IL-2 и без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо цитокинов в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых воплощениях стандартная доза морфина за 1 час вливания, т.е. стандартная скорость вливания во время введения антитела составляет 50 мкг/кг/ч. В некоторых воплощениях стандартная доза морфина за 1 ч вливания, т.е. стандартная скорость вливания во время введения антитела составляет 30 мкг/кг/ч. В некоторых воплощениях стандартная доза морфина составляет 50, 40, 30 и/или 20 мкг/кг/ч. В некоторых воплощениях стандартная доза морфина составляет 0,9, 0,72, 0,48, 0,38, 0,4375 и/или 0,205 мг/кг/день. В некоторых воплощениях стандартная доза морфина составляет 7,2, 4,8, 4,5, 2, 1,75 и/или 0,82 мг/кг/цикл. В некоторых воплощениях стандартная доза морфина составляет 43,2, 28,8, 13,5, 10, 8,75 и/или 4,1 мг/кг за все время лечения. В некоторых воплощениях стандартная доза индометацина составляет от 0,3 до 0,5 мг/кг либо 25 или 50 мг на 1 дозу перорально или внутривенно каждые 6 ч. В некоторых воплощениях стандартные дозы морфина при обычных схемах вливания (с введением цитокинов), приведенные выше в сравнении с дозами морфина при схемах вливания согласно изобретению (без введения цитокинов), относятся к тем дозам морфина, которые фактически вводятся пациентам (например, к соответствующим средним значениям доз морфина, вводимым всем проходящим лечение пациентам одной группы при лечении в одних и тех же условиях).

Дозы морфина при схемах вливания согласно изобретению, приведенные здесь в сравнении с дозами морфина при обычных схемах вливания, могут относиться к пониженным стандартным дозам морфина для данной схемы согласно изобретению или к пониженным дозам морфина, предписанным для данной схемы (например, приведенным в протоколах клинических исследований). В некоторых воплощениях пониженная доза морфина по схеме вливания согласно изобретению за 1 ч вливания, т.е. скорость вливания в течение одного или нескольких часов или дней введения антитела по изобретению без IL-2, а в некоторых воплощениях без GM-CSF, а в некоторых воплощениях без каких-либо цитокинов, составляет менее 50 мкг/кг/ч. В некоторых воплощениях доза морфина за 1 час вливания, т.е. скорость вливания в течение одного или нескольких часов или дней введения антитела по изобретению составляет менее 30 мкг/кг/ч. В некоторых воплощениях дозы морфина при схемах вливания согласно изобретению, приведенные выше в сравнении с дозами морфина при обычных схемах вливания, относятся к тем дозам морфина, которые фактически вводятся пациентам (например, соответствующим средним значениям доз морфина, вводимым всем проходящим лечение пациентам одной группы при лечении в одних и тех же условиях).

В общем индивидуальные дозы анальгетиков могут варьироваться в зависимости от индивидуальной переносимости боли у пациентов. Дозировку можно адаптировать для получения оптимальной анальгезии.

Период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, можно комбинировать с одним или несколькими периодами приема ретиноида, одним или несколькими периодами приема анальгетика, одним или несколькими периодами приема других препаратов или средств (за исключением приема цитокинов) и/или одним или несколькими периодами отсутствия лечения. В одном воплощении период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, комбинируется с одним или несколькими таки-

ми другими периодами лечения, составляя один цикл лечения. Соответственно в одном воплощении цикл лечения включает в себя период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, и необязательно один или несколько периодов приема других препаратов, средств и/или процедур (за исключением приема цитокинов). Любые такие периоды лечения в пределах одного цикла лечения могут частично и/или полностью перекрываться, как описано далее здесь.

В одном воплощении пациент, который получает антитело, также получает ретиноид (например, изотретиноин) и необязательно морфин и/или один или несколько производных морфина и/или один или несколько других анальгетиков. В одном воплощении периоду лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, не предшествует и/или за ним не следует период приема одного или нескольких цитокинов. В одном воплощении период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, не сопровождается периодом приема морфина и/или одного или нескольких анальгетиков. В одном воплощении период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, не сопровождается периодом приема одного или нескольких цитокинов. В одном воплощении периоду лечения препаратом, содержащим антитело против GD2, не предшествует и/или за ним не следует период приема одного или нескольких цитокинов и он не сопровождается периодом приема одного или нескольких цитокинов.

В одном воплощении один цикл лечения включает от 28 до 49 дней, например 28, 35, 42 или 49 дней или же в любом промежутке между этими периодами. Цикл лечения начинается с того дня, когда пациент впервые получает любую из процедур, содержащихся в данном цикле (и может обозначаться как день 0 или день 1), например введение препарата, содержащего антитело против GD2, и/или любого другого препарата или лечения (за исключением приема цитокинов).

Периоду введения антитела против GD2 может предшествовать, сопровождать его и/или следовать за ним период приема ретиноида (например, изотретиноина) либо непосредственно, либо с интервалом в один или несколько дней без лечения, например 1, 2, 3, 4 или 5 дней без лечения. В одном воплощении ретиноид (например, изотретиноин) вводится перорально два раза в день в дозе $160 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ (в равных дозах, т.е. $2 \times 80 \text{ мг/м}^2$). В одном воплощении ретиноид (например, изотретиноин) вводится в течение 14 дней, например, с 1- до 14-го дня цикла лечения или с 19 дня по 32 день цикла лечения. За периодом приема ретиноида (например, изотретиноина) может следовать промежуток в один или несколько дней без лечения, например, 1, 2, 3, 4 или 5 дней без лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 1 по 14 день цикла лечения, а затем 7 дней без лечения (дни 15-21 цикла лечения), и 5-дневный период введения антитела против GD2 (например, вливанием при $20 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ на протяжении 8 ч с введением дозы в $100 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 22 по 26 день цикла лечения, после чего начинается следующий цикл на 29-й день, который становится 1-м днем следующего цикла лечения. В других воплощениях цикл лечения включает в себя один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 1 по 14 день цикла лечения, за которым следует один 5-дневный период введения антитела против GD2 (например, вливанием при $20 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ на протяжении 8 ч с введением дозы в $100 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 22 по 28 день цикла лечения, после чего начинается следующий цикл на 29-й день, который становится 1-м днем следующего цикла лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 10-дневный период введения антитела против GD2 (например, при 10 или $15 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ с введением дозы в 100 или $150 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 8 по 17 день цикла лечения, и один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 19 по 32 день цикла лечения, а затем следуют 3 дня без лечения, после чего начинается следующий цикл на 36-й день, который становится 1-м днем второго цикла лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 14-дневный период введения антитела против GD2 (например, при 7 или $15 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ с введением дозы в 100 или $210 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 8 по 21 день цикла лечения, и один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 26 по 39 день цикла лечения, а затем следуют 3 дня без лечения, после чего начинается следующий цикл на 43-й день, который становится 1-м днем второго цикла лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 15-дневный период введения антитела против GD2 (например, при $10 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ с введением дозы в $150 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 8 по 22 день цикла лечения, и один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 26 по 39 день цикла лечения, а затем следуют 3 дня без лечения, после чего начинается следующий цикл на 43-й день, который становится 1-м днем второго цикла лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 21-дневный период введения антитела против GD2 (например, при 7 или $10 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ с введением дозы в 150 или $210 \text{ мг/м}^2/\text{цикл}$), например с 8 по 28 день цикла лечения, и один 14-дневный период приема ретиноида (например, изотретиноина), например с 33 по 46 день цикла лечения, а затем следуют 3 дня без лечения, после чего начинается следующий цикл на 50-й день, который становится 1-м днем второго цикла лечения.

В одном воплощении цикл лечения включает в себя один 4-дневный период лечения препаратом, содержащим антитело против GD2 (например, ch14.18/SP2/0), к примеру, при введении в дозе 25, 20, 17,5 или $15 \text{ мг/м}^2/\text{день}$, например с 3 по 6 день 24-дневного цикла лечения, начиная с дня 0, или с 7 по 10 день 32-дневного цикла лечения, начиная с дня 0, например в течение 5 циклов; и один период приема RA,

например изотретиноина, с 10 по 23 день цикла лечения, начиная с дня 0, или с 14 по 27 день цикла лечения, начиная с дня 0. В одном воплощении схема лечения такая же, как приведенная в табл. 2, 3 и/или 4, но без IL-2, а в некоторых воплощениях и без IL-2, и без GM-CSF, а в некоторых воплощениях вообще без каких-либо цитокинов. Соответственно в одном воплощении схема лечения такая же, как приведенная в табл. 2, 3 и/или 4, но вообще без цитокинов.

Цикл лечения может повторяться либо в таком же, либо в измененном виде, например, при другой дозе или по другой схеме, или же с другими дополнительными обработками (например, с одним или несколькими другими анальгетиками). Так, общее время лечения (например, период времени, включающий все следующие друг за другом циклы лечения, или весь период непрерывного лечения), может составлять по меньшей мере 1 или 2 либо несколько циклов или же 10 или больше циклов. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в течение двух или нескольких циклов лечения. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение двух или нескольких циклов лечения. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение двух или нескольких циклов лечения без одновременного введения IL-2. В одном воплощении препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания без одновременного введения IL-2 в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 циклов или больше. В одном воплощении общее время лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 циклов или больше. Общее время лечения даже может составлять до 20 или больше циклов лечения. Как описано выше, циклы лечения могут включать периоды времени без лечения (промежутки, в которых пациент не получает никакого лечения, т.е. ни антитела, ни цитокина, ни каких-либо других препаратов). Таким образом, в настоящем изобретении общее время лечения также может включать такие промежутки без лечения в пределах циклов лечения.

В одном воплощении 35-, 42- или 49-дневный цикл лечения, как указано выше, повторяется по меньшей мере 4 или 5 раз, так что весь период непрерывного лечения составляет по меньшей мере 5 или 6 циклов лечения.

Эффект применения антитела без одного или нескольких цитокинов можно определить методом анализа зависящего от комплемента цитолиза (CDC) или испытания на цельной крови (WBT). WBT представляет собой метод, в котором клетки мишени или компоненты мишени (т.е. клетки, липосомы или другие клеткоподобные компартменты, подлежащие лизису) подвергаются контакту с обработанной соответствующим антикоагулянтом цельной кровью от пациента. Метод CDC может представлять собой, к примеру, стандартный метод CDC, известный в данной области (например, как описано в Indusogie et al., *J. Immunol.*, 2000, 164(8):4178-84; Zeng et al., *Molecular Immunology*, 2005, 42(11):1311-9; или в WO 2005/070967). Метод CDC и/или WBT может выполняться на GD2-положительных клетках мишени типа клеток раковой линии подлежащего лечению GD2-положительного рака. Например, если подлежащий лечению пациент страдает нейробластомой, то линия клеток может быть представлена линией клеток нейробластомы, такой, например, как клетки нейробластомы LAN-1 человека. В другом примере, если подлежащий лечению пациент страдает меланомой, то линия клеток может быть представлена линией клеток меланомы, такой, например, как клетки меланомы M21 человека. В еще одном примере клетки мишени при анализе CDC и/или WBT представлены опухолевыми клетками, полученными от пациента, т.е. аутологичными опухолевыми клетками пациента. В другом воплощении компонентом мишени при анализе CDC и/или WBT являются липосомы, несущие GD2 на поверхности. Клетки мишени или компоненты мишени метятся сигнальным компонентом, например, радиоактивным компонентом типа ^{51}Cr или флуоресцентным компонентом типа кальцеина. Сигнальный компонент содержится в клетках мишени или компонентах мишени, т.е. внутри клеток мишени или компонента мишени (например, липосом, заполненных сигнальным компонентом и проявляющих GD2 на поверхности), и высвобождается после лизиса клеток мишени или компонентов мишени. Таким образом, сигнальный компонент обеспечивает считывание результатов анализа. Клетки или компоненты мишени, нагруженные сигнальным соединением, подвергаются контакту с цельной кровью, сывороткой или плазмой в определенном соотношении. Цельная кровь, плазма или сыворотка для CDC или WBT могут быть разбавлены, например, в соотношении 1:2 или выше, например, 1:4, 1:5 или 1:10 или же в любом промежутке между этими соотношениями перед добавлением их в образцы. Однако их также можно добавлять в образцы и неразбавленными. Конечная концентрация цельной крови, плазмы или сыворотки в образцах для CDC или WBT может составлять, например, от 10 до 50%. Лизис клеток мишени или компонентов мишени можно измерять по высвобождению указанного сигнального компонента на сцинтилляционном счетчике или методом спектрофотометрии. Например, лизис клеток мишени или компонентов мишени можно измерять путем определения количества ^{51}Cr , высвобождающегося в супернатант, на сцинтилляционном счетчике. Степень лизиса в процентах можно определять по следующему уравнению:

$$100 \times (\text{высвобождение в опыте-спонтанное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение-спонтанное высвобождение})$$

Для анализа CDC цитолитические компоненты (или эффекторные компоненты) обеспечиваются сывороткой или обработанной соответствующим антикоагулянтом плазмой, полученной от пациента или

донора и содержащей компоненты системы комплемента. Для метода WBT цитолитические компоненты (или эффекторные компоненты) обеспечиваются обработанной соответствующим антикоагулянтом цельной кровью, полученной от пациента или донора и содержащей компоненты системы комплемента, а также все клеточные компоненты, а также любые другие компоненты, содержащиеся в цельной крови, которые могли бы иметь отношение к лизису клеток мишени, а также взаимодействию всех компонентов (например, известно, что активация комплемента активирует определенные эффекторные клетки типа гранулоцитов). Для CDC и/или WBT сыворотку, плазму или цельную кровь можно добавлять к клеткам мишени или компонентам мишени в различных разведениях.

Кроме того, в один или несколько образцов для анализа CDC и/или WBT можно добавить антитело против GD2 в различных концентрациях, например, для составления стандартной кривой.

В другом воплощении в образцы можно добавить одно или несколько антиидиотипических (анти-Id) антител против GD2, распознающих переменный домен антител против GD2, чтобы заингибировать лизис клеток мишени, опосредованный антителом, например, в качестве отрицательного контроля или для проверки специфичности анализа и того, что лизис клеток мишени, измеряемый без анти-Id антител, опосредован антителом или зависит от антител.

В некоторых воплощениях повышенный уровень цитолиза после одного или нескольких первых дней введения антитела (по сравнению с уровнем цитолиза до введения антитела) сохраняется на протяжении всего цикла лечения. В некоторых воплощениях такой повышенный уровень цитолиза сохраняется на протяжении всего времени лечения, т.е. даже в те периоды времени, когда пациент не получает препарата, содержащего антитело против GD2, т.е. в промежутках между периодами лечения препаратом, содержащим антитело против GD2 (если таковые имеются, т.е. если пациент не получает непрерывно на протяжении всего времени лечения препарат, содержащий антитело против GD2).

В одном воплощении уровень цитолиза (уровень лизиса клеток мишени, например, при измерении методом CDC или WBT) в образцах крови пациента, обработанных в соответствии с настоящим изобретением, повышается по сравнению с уровнем цитолиза до первого периода лечения препаратом, содержащим антитело, на протяжении всего периода времени, начинающегося с конца первого периода введения антитела до конца последнего цикла лечения, т.е. даже в промежутках между периодами введения антитела. В одном воплощении данный уровень цитолиза составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или же в любом промежутке между этими уровнями, на протяжении всего периода времени, начинающегося с конца первого периода введения антитела до конца последнего цикла лечения. В одном воплощении уровень цитолиза после первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого и/или десятого периода введения антитела против GD2 составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или же в любом промежутке между этими уровнями. В одном воплощении уровень цитолиза перед вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым, седьмым, восьмым, девятым и/или десятым периодом введения антитела против GD2 составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или же в любом промежутке между этими уровнями.

Примеры

Пример 1. Последовательности APN311 и связанные с этим данные.
Данные о последовательности APN311.

Таблица 5

Молекулярный вес (mw) и pI (расчетные)

	pI ¹⁾	MW [Д] ¹⁾	Кол-во а.к.	Условия	2D-DIGE ²⁾
Антитело	8,61	144701,10	1324	невосстановит.	X
Антитело (½)	8,58	72359,56	662	восстановит.	X
Тяжелая цепь	8,58	48306,59	442	восстановит.	X
Легкая цепь	8,48	24070,98	220	восстановит.	X

1) Рассчитывали через http://web.expasy.org/compute_pi/.

2) В связи с молекулярной массой красителей следует ожидать сдвига в сторону небольшого повышения молекулярного веса при 2D-DIGE.

Нуклеотидная последовательность (кДНК, вкл. лидерную).

"TAG" работает в качестве "стоп-кодона" и поэтому не транслируется в пептидную последовательность.

Легкая цепь (SEQ ID NO: 1).

~~1 ATG GAA GCC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CGA GAT ACC ACT GCA~~
 61 GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
 121 CTC TCC TGC AGA TCT AGT CAG AGT CTT GTA CAC CGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG
 181 TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATT CAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT
 241 TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC
 301 AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGT TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT
 361 CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT
 421 GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC
 481 CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC
 541 CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC
 601 CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC
 661 GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT
 721 TAG

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 2).

~~1 ATG GGA TGG ACC TGG ATC TTT ATT TTA ATC CTC TCG CTA ACT ACA GGT GTC CAC TCT GAG~~
 61 GTC CAA CTG CTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GAG AAG CCT GGC GCT TCA GTG ATG ATA TCC
 121 TGC AAG GCT TCT GGT TCC TCA TTC ACT GGC TAC AAC ATG AAC TGG GTG AGG CAG AAC ATT
 181 GGA AAG AGC CTT GAA TGG ATT GGA GCT ATT GAT CCT TAC TAT GGT GGA ACT AGC TAC AAC
 241 CAG AAG TTC AAG GGC AGG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCG TCC AGC ACA GCC TAC ATG
 301 CAC CTC AAG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GTA AGC GGA ATG GAG
 361 TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC
 421 TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG
 481 GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC
 541 GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG
 601 GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG
 661 CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
 721 TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
 781 AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC
 841 GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
 901 AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
 961 CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC
 1021 AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 1081 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG
 1141 ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
 1201 CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC
 1261 CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
 1321 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG
 1381 GGT AAA TGA

Нуклеотиды 1-60 (перечеркнуты): лидерная последовательность.

Последние нуклеотиды (перечеркнуты): стоп-кодон.

Пептидная последовательность (вкл. сигнальный пептид).

Сигнальный пептид отщепляется во время посттрансляционного процессинга и больше не является частью конечного рекомбинантного белка.

Легкая цепь (SEQ ID NO: 3).

~~1 M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G~~
 21 E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T
 41 L S C R S S Q S L V H R N G N T Y L H W
 61 Y L Q K P G Q S P K L L I H K V S N R F
 81 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 101 S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P
 121 P L T F G A G T K L E L K R T V A A P S
 141 V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C
 161 L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
 181 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S
 201 L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
 221 E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 4).

~~1 M C W T W I F I L I L S V T T G V H S E~~
 21 V Q L L Q S G P E L E K P G A S V M I S
 41 C K A S G S S F T G Y N M N W V R Q N I
 61 G K S L E W I G A I D P Y Y G G T S Y N
 81 Q K F K G R A T L T V D K S S S T A Y M
 101 H L K S L T S E D S A V Y Y C V S G M E
 121 Y W G Q G T S V T V S S A S T K G P S V
 141 F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
 161 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S
 181 G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 201 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K
 221 P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T
 241 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
 261 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
 281 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
 301 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V
 321 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
 341 K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
 361 P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L
 381 T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 401 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F
 421 L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
 441 S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
 461 G K

Аминокислоты 1-20 (перечеркнуты): лидерная последовательность.

Были произведены две соответствующие GMP партии антитела ch14.18/CHO (APN311). Эти две партии препарата, которые были произведены: серия Т651204-А (содержащая 4,3 мл антитела (4,6 мг/мл)) и серия Т900310-А (содержащая 4,5 мл антитела (4,5 мг/мл)). Нефасованный препарат моноклонального антитела APN311 производится в виде концентрата для приготовления препаратов для в/в вливания.

Состав конечного препарата APN311

Название продукта	химерное моноклональное антитело мышь-человек против GD2 (ch14.18/CHO; APN311)
Содержание	4,25–4,75 мг/мл (точное содержание на 1 мл может слегка отличаться от серии к серии и приводится на каждом флаконе)
Буфер	20 мМ гистидин, 5% сахароза, 0,01% Tween 20, вода для инъекций
Значение pH	5,5–6,5
Наполнитель	нет

Инструкция по приготовлению.

Антитело должно быть приготовлено в стерильных условиях. Соответствующий объем антитела ch14.18/CHO (APN311) следует извлечь из флакона. Рекомендуется профильтровать раствор антитела (от 0,2 до 1,2 мкм) перед введением пациенту, либо с помощью встроенного фильтра во время вливания (как это обычно делают некоторые центры), либо путем фильтрации раствора через фильтр для частиц (например, фильтр Nr. MF1830, Impromediform, Германия). Объем антитела добавляется в инфузионный пакет, содержащий 0,9% NaCl и 1% сывороточного альбумина человека (HSA), например, 100 мл 0,9% NaCl и 5 мл 20% сывороточного альбумина человека.

Расчет количества ch14.18/CHO (APN311) для разведения.

Количество ch14.18/CHO (APN311) для введения рассчитывается следующим образом. Дозировка: 10 мг/м²/день, день 8-17, в виде 24-часового вливания.

Пример расчета: если у пациента площадь поверхности тела (BSA) составляет 0,7, то нужно 7 мг (10×0,7) в день или 70 мг на 10 дней лечения (один цикл).

Пример 2. Пациенты, получавшие APN311 без IL-2 (и без других цитокинов), по сравнению с данными Yu et al. 2010, NEJM (цитировано выше).

Данные, лежащие в основе этого примера, были получены в исследовании 1.5 на нейробластоме с высокой степенью риска SIOP-Europe (SIOPEN), EudraCT за номером 2006-001489-17. Пациенты с нейробластомой высокой степени риска после миелоаблативной терапии (MAT) и пересадки аутологичных стволовых клеток (ASCR), а также в зависимости от обстоятельств и других видов терапии типа облучения, других средств химиотерапии, хирургии и т.д. получали до 5 циклов по 20 мг/м²/день ch14.18/CHO при введении в виде 8-часового в/в вливания в течение 5 дней подряд (с 22 по 26 день цикла лечения) в 28-дневных циклах. Это соответствует общей дозе ch14.18/CHO в 100 мг/м²/цикл. цис-РА вводили перорально два раза в день в дозе 160 мг/м²/день с 1 по 14 день цикла лечения (по две равные дозы в день, т.е. 2×80 мг/м²). В одной группе не вводили IL-2 во время цикла лечения и за все время лечения. Пациенты другой группы получали IL-2 в дозе 6×10⁶ МЕ/м²/день с 15 по 19 и с 22 по 26 день цикла лечения. Пациентов лечили за 6 циклов лечения, причем 1-5-й циклы лечения были такими, как описано выше, а шестой цикл лечения составлял период лечения только изотретиноином (без введения антитела и без IL-2).

Анализировали выживаемость без рецидива (event-free survival, EFS) и выживаемость в целом (overall survival, OS). Также анализировали EFS и OS в подгруппе пациентов, которые проявились как полностью восприимчивые в самом начале лечения антителом (без признаков опухоли при всех проводившихся обследованиях). Данные по EFS и OS в этой подгруппе сравнивали с данными по EFS и OS при схеме лечения с антителом, IL-2 и GM-CSF и изотретиноином (цис-РА), как описано в Yu et al. (NEJM 2010, приведенная выше ссылка), которые включены в табл. 7.

Пациенты у Yu et al. получали ch14.18/SP2/0 в дозе 25 мг/м²/день в течение 4 дней подряд, причем дозы ch14.18/SP2/0 вводили в/в вливанием на протяжении 5,75 ч или 10 ч (могли продлеваться до 20 ч при ожидаемой токсичности). IL-2 вводили каждый второй цикл (например, циклы 2 и 4) в виде непрерывного в/в вливания в течение 4 дней (96 ч) по 3 мМЕ/м²/день в 1-ю неделю цикла лечения и по 4,5 мМЕ/м²/день во 2-ю неделю цикла лечения (т.е. 30 мМЕ/м²/цикл). GM-CSF вводили п/к в суточной дозе 250 мкг/м² в течение 14 дней (со дня 0 до 13-го дня). Общее время лечения составляет 5 циклов лечения. См. также табл. 2, 3 и 4 насчет соответствующих схем лечения. Значения EFS и OS в Yu et al., приведенные здесь на фиг. 2 и 3 для сравнения, включают только полностью восприимчивых при вышеописанном лечении. Таким образом, для прямого сравнения использовалась только подгруппа полностью восприимчивых к лечению по изобретению.

Таблица 7

2-Летняя выживаемость без рецидива (EFS) и общая выживаемость (OS) у полностью восприимчивых (CR) к APN311-302 в сравнении с Yu et al. (NEJM 2010, цитировано выше) в процентах

	2-летняя EFS в %	2-летняя OS в %
Подгруппа CR в начале рандомизации при исследовании APN311-302: APN311+цис-РА	70	81
NEJM 2010: ch14.18+IL2+GM-CSF+цис-РА	66	86
NEJM 2010: только цис-РА	46	75

Результаты также представлены на фиг. 1, 2 и 3 (тоже в сравнении с Yu et al.) и на фиг. 4-15 (более подробно о токсичности, т.е. наблюдавшихся неблагоприятных эффектах или побочных эффектах). Со-

гласно этим данным, IL-2 не способствует эффективности лечения антителом против GD2. Однако сопутствующий прием IL-2 существенно усиливает побочные эффекты и токсичность. Лечение APN311+цис-RA у полностью восприимчивых с самого начала иммунотерапии дает значения 2-летней выживаемости без рецидива и общей выживаемости и кривые выживаемости в целом, близкие таковым в группе ch14.18/SP2-0+IL2+GM-CSF+цис-RA в исследовании NEJM 2010 (Yu et al., приведенная выше ссылка).

Это свидетельствует о том, что добавление как IL2, так и GM-CSF не нужно для достижения такого уровня эффективности комбинированного лечения, как описано в NEJM 2010.

Значения EFS и OS при APN311+цис-RA (у полностью восприимчивых с самого начала иммунотерапии) улучшаются по сравнению с EFS и OS у пациентов NEJM 2010, получавших только цис-RA (2у-EFS: 70% против 46%; 2у-OS: 81% против 75%; также см. табл. 7). Это указывает на эффективность монотерапии APN311.

Поэтому при общей оценке риска и пользы сделан вывод, что APN311+цис-RA у полностью восприимчивых с самого начала иммунотерапии даже может превосходить 4-компонентную иммунотерапию, описанную в NEJM 2010, особенно вследствие существенного снижения побочных эффектов и уменьшения сложности лечения вследствие исключения IL2 и GM-CSF, а также вследствие близкой клинической эффективности в плане EFS и OS.

Пример 3. Анализ CDC и WBT у пациента с нейробластомой при лечении антителом.

Пациент с нейробластомой получал APN311 в режиме непрерывного вливания, т.е. получал антитело в виде непрерывного вливания на протяжении 24 ч в сутки в течение 10 дней подряд (с 1 по 10 день цикла лечения) в дозе 10 мг/м²/день в течение 6 следующих друг за другом циклов. Каждый цикл лечения составлял 35 дней. Во время каждого цикла лечения и за все время лечения из данных 6 следующих друг за другом циклов пациент получал только лечение антителом и не получал ни цитокинов, ни ретиноидов.

У данного пациента в указанные моменты времени брали образцы крови и анализировали методами CDC и WBT, как описано в примерах 4 и 5. Результаты представлены на фиг. 16. Из фиг. 16 видно, что лечение антителом без применения цитокинов вызывало повышение уровня лизиса опухолевых клеток. Эти уровни лизиса опухолевых клеток сравнимы с уровнями у пациентов, получавших антитело и IL-2 (один репрезентативный пациент представлен на фиг. 17). Пациент, представленный на фиг. 17, получал лечение по той же схеме, что и пациент, представленный на фиг. 16, но дополнительно получал IL-2 п/к в дозе 6×10⁶ МЕ/м²/день с 1 по 5 и с 8 по 12 день.

Как можно видеть, особенно на фиг. 16B, повышенный уровень лизиса клеток мишени при анализе на цельной крови (WBT) сохраняется даже в те периоды времени в пределах общего времени лечения, когда пациент не получал препарата, содержащего антитело против GD2, т.е. в промежутках между периодами лечения препаратом, содержащим антитело против GD2.

Пример 4. Методика анализа CDC.

Принцип метода CDC (комплементзависимой цитотоксичности).

Определяется степень цитотоксичности для опухолевых клеток нормальной сыворотки или плазмы человека в присутствии APN301 или APN311 либо сыворотки или плазмы пациентов после вливания одного из этих антител на положительной по антигену GD2 линии раковых клеток нейробластомы LAN-1 (клетки мишени) методом анализа высвобождения ⁵¹Cr. Клетки мишени инкубируют с Na₂⁵¹Cr(VI)O₄, который проникает через клеточную мембрану и связывается с цитоплазматическими белками в виде восстановленного III-валентного Cr, который уже не вытекает из интактных клеток. При лизисе этих клеток после инкубации с сывороткой или плазмой и антителами либо с сывороткой или плазмой пациентов радиоактивность высвобождается в супернатант в зависимости от литического потенциала исследуемых образцов.

В каждом отдельном эксперименте определяется спонтанный фоновый лизис и полный лизис (максимально достижимый лизис клеток или максимально возможный лизис клеток мишени) под действием поверхностно-активного вещества. После вычитания спонтанного лизиса рассчитывают лизис, вызванный исследуемыми образцами, в % от общего лизиса.

Получение образцов сыворотки или плазмы.

Брали пробы цельной крови у здоровых доноров или у пациентов, используя гепаринизованные флаконы Vacutainer для плазмы или вызывающие свертывание крови флаконы для сыворотки. Флаконы центрифугировали при 2000×g в течение 20 мин. Супернатанты плазмы или сыворотки использовали сразу для анализа либо хранили при -20°C (не допускается оттаивание и повторное замораживание).

Мечение клеток мишени с помощью ⁵¹Cr.

Клетки LAN-1 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FCS. За день до анализа их переносили в новые колбы со свежей средой. Анализ проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах для клеточных культур, используя по 4×10⁴ меченых клеток на лунку с активностью 800 нКи ⁵¹Cr на лунку. Из флаконов с культурами отбирали нужное количество клеток, суспензию центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл PBS с 0,1% ЭДТА и 1% FCS. Добавляли

рассчитанный объем раствора ^{51}Cr и инкубировали клетки в течение 90 мин при 37°C и 5% CO_2 с осторожным вращением пробирок.

Затем суспензию клеток дважды промывали средой для культивирования клеток, чтобы удалить радиоактивность снаружи от клеток. Эта среда дополнительно содержала 100 ед/мл пенициллина G и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата. Осадок меченых клеток после стадии отмывки ресуспендировали до требуемой концентрации в 4×10^5 клеток/мл.

Процедура анализа.

Для оценки цитолитической способности антител вносили пипеткой следующее:

50 мкл образца (разведения антитела);

100 мкл разведенной 1:4 нормальной сыворотки или плазмы человека;

100 мкл меченой ^{51}Cr суспензии клеток (4×10^5 на мл).

Для оценки цитолитической способности плазмы или сыворотки пациентов вносили пипеткой следующее:

50 мкл среды;

100 мкл разведенной 1:4 плазмы или сыворотки пациента;

100 мкл меченой ^{51}Cr суспензии клеток (4×10^5 на мл).

Планшеты для анализа CDC инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 , в течение 4 ч, а при непосредственном сравнении с WBT в течение 20 ч.

Кроме того, аликвоту из каждой пробы крови преинкубировали с ganglidiomab, моноклональным антителом мыши против ch14.18 (антиидиотипическое антитело), а затем обрабатывали так, как описано выше. Оно специфически связывается с антителом, находящимся в пробе крови после введения этого антитела пациенту. При этом антиидиотипическое антитело ингибирует способность данного антитела вызывать лизис опухолевых клеток мишени в сочетании с клетками крови (WBT) и/или компонентами плазмы (CDC). Остаточный лизис можно определить как не опосредованный антителом эффект.

Затем из каждой лунки отбирали супернатанты с помощью рамочного харвестера с поглощающими картриджами и всасывающим прессом (Skatron). Эти картриджи, пропитанные клеточными супернатантами, переносили в измерительные флаконы гамма-счетчика. Во всех образцах измеряли радиоактивность, которая пропорциональна высвобождению ^{51}Cr после повреждения меченых клеток мишени, и выражали ее в импульсах за 1 мин (срм). Результаты рассчитывали в % лизиса за вычетом значений срм при спонтанном лизисе в каждом образце и относительно значений срм при максимально достижимом лизисе с поверхностно-активным веществом, который принимали за 100%:

$$\% \text{ лизиса в образце} = \frac{\text{срм образца} - \text{срм при спонтанном лизисе}}{\text{срм при максимальном лизисе} - \text{при спонтанном лизисе}} \times 100.$$

Вышеописанная методика анализа CDC применялась для результатов, представленных на фиг. 16А.

Пример 5. Методика WBT.

Принцип метода WBT.

Определяется степень цитотоксичности для опухолевых клеток нормальной цельной крови человека в присутствии APN301 или APN311 или цельной крови пациентов после вливания одного из этих антител на положительной по антигену GD2 линии раковых клеток нейробластомы LAN-1 (клетки мишени) методом анализа высвобождения ^{51}Cr .

Клетки мишени инкубируют с $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}(\text{VI})\text{O}_4$, который проникает через клеточную мембрану и связывается с цитоплазматическими белками в виде восстановленного 111-валентного Cr, который уже не вытекает из интактных клеток. При лизисе этих клеток после инкубации с цельной кровью и антителами либо с цельной кровью пациентов радиоактивность высвобождается в супернатант в зависимости от литического потенциала исследуемых образцов.

В каждом отдельном эксперименте определяется спонтанный фоновый лизис и полный лизис (максимально достижимый лизис клеток или максимально возможный лизис клеток мишени) под действием поверхностно-активного вещества. После вычитания спонтанного лизиса рассчитывают лизис, вызванный исследуемыми образцами, в % от общего лизиса.

Получение образцов крови.

Брали пробы цельной крови у здоровых доноров или у пациентов, используя гепаринизованные флаконы Vacutainer.

Мечение клеток мишени с помощью ^{51}Cr .

Клетки LAN-1 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FCS. За день до анализа их переносили в новые колбы со свежей средой. Анализ проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах для клеточных культур, используя по 4×10^4 меченых клеток на лунку с активностью 800 нКи ^{51}Cr на лунку. Из флаконов с культурами отбирали нужное количество клеток, суспензию центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл PBS с 0,1% ЭДТА и 1% FCS. Добавляли рассчитанный объем раствора ^{51}Cr и инкубировали клетки в течение 90 мин при 37°C и 5% CO_2 с осторожным вращением пробирок.

Затем суспензию клеток дважды промывали средой для культивирования клеток, чтобы удалить ра-

диоактивность снаружи от клеток. Эта среда дополнительно содержала 100 ед/мл пенициллина G и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата. Осадок меченых клеток после стадии отмывки ресуспендировали до требуемой концентрации в 4×10^5 клеток/мл.

Процедура анализа.

Для оценки цитолитической способности антител вносили пипеткой следующее:

50 мкл образца (разведения антитела);

100 мкл разведенной 1:2 нормальной цельной крови человека;

100 мкл меченой ^{51}Cr суспензии клеток (4×10^5 на мл).

Для оценки цитолитической способности цельной крови пациентов вносили пипеткой следующее:

50 мкл среды;

100 мкл разведенной 1:2 крови пациента;

100 мкл меченой ^{51}Cr суспензии клеток (4×10^5 на мл)

Планшеты для анализа инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 , в течение 20 ч.

Кроме того, аликвоту из каждой пробы крови преинкубировали с ganglidiomab, моноклональным антителом мыши против ch14.18 (антиидиотипическое антитело), а затем обрабатывали так, как описано выше. Оно специфически связывается с антителом, находящимся в пробе крови после введения этого антитела пациенту. При этом антиидиотипическое антитело ингибирует способность данного антитела вызывать лизис опухолевых клеток мишени в сочетании с клетками крови (WBT) и/или компонентами плазмы (CDC). Остаточный лизис можно определить как не опосредованный антителом эффект.

Затем из каждой лунки отбирали супернатанты с помощью рамочного харвестера с поглощающими картриджами и всасывающим прессом (Skatron). Эти картриджи, пропитанные клеточными супернатантами, переносили в измерительные флаконы гамма-счетчика. Во всех образцах измеряли радиоактивность, которая пропорциональна высвобождению ^{51}Cr после повреждения меченых клеток мишени, и выражали ее в импульсах за 1 мин (срм). Результаты рассчитывали в % лизиса за вычетом значений срм при спонтанном лизисе в каждом образце и относительно значений срм при максимально достижимом лизисе с поверхностно-активным веществом, который принимали за 100%:

$$\% \text{ лизиса в образце} = \frac{\text{срм образца} - \text{срм при спонтанном лизисе}}{\text{срм при максимальном лизисе} - \text{при спонтанном лизисе}} \times 100.$$

Вышеописанная методика WBT применялась для результатов, представленных на фиг. 16В.

Далее изобретение раскрывается на следующих воплощениях, которые можно легко комбинировать с любым пунктом формулы изобретения.

1. Препарат, содержащий антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2, при этом одному или нескольким периодам введения антитела предшествует, сопровождает их и/или следует за ними один или несколько периодов приема ретиноида.

2. Препарат, содержащий антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту без одновременного введения IL-2, при этом одному или нескольким периодам введения антитела предшествует, сопровождает их и/или следует за ними один или несколько периодов приема ретиноида в пределах одного и того же цикла лечения.

3. Препарат, содержащий антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней без одновременного введения IL-2.

4. Препарат, содержащий антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней и на протяжении двух или нескольких циклов лечения без одновременного введения IL-2.

5. Препарат, содержащий химерное или гуманизованное антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней без одновременного введения IL-2.

6. Препарат, содержащий антитело против GD2, для применения при лечении GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания без одновременного введения IL-2, при этом антитело против GD2 не представлено антителом 14G2a.

7. Способ лечения GD2-положительного рака у пациента, включающий введение пациенту антитела против GD2 без одновременного введения IL-2, при этом происходит лечение GD2-положительного рака.

8. Способ лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего антитело против GD2, причем пациент не получает одновременно IL-2, при этом одному или нескольким периодам введения антитела предшествует, сопровождает их и/или следует за ними один или несколько периодов приема ретиноида.

9. Способ лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего антитело против GD2, причем пациент не получает одновременно IL-2, и при этом одному или нескольким периодам введения антитела предшествует, сопровождает их и/или следует за ними один или несколько периодов приема ретиноида в пределах одного и того же цикла лечения.

10. Способ лечения GD2-положительного рака путем введения пациенту препарата, содержащего антитело против GD2, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней без одновременного введения IL-2.

11. Способ лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней и на протяжении двух или нескольких циклов лечения, и при этом пациент не получает одновременно IL-2.

12. Способ лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий химерное или гуманизованное антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания в течение одного или нескольких дней без одновременного введения IL-2.

13. Способ лечения GD2-положительного рака у пациента, причем препарат, содержащий антитело против GD2, вводится пациенту в виде непрерывного вливания, при этом пациент не получает одновременно IL-2, а антитело против GD2 не представлено антителом 14G2a.

14. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациент не получает одновременно GM-CSF.

15. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациент не получает цитокинов.

16. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациент не получает цитокинов в пределах одного и того же цикла лечения.

17. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациент не получает цитокинов в пределах одного и того же общего времени лечения.

18. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациент мог получать IL-2, GM-CSF и/или один или несколько других цитокинов в одном или нескольких предыдущих циклах лечения и/или во все время лечения.

19. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом GD2-положительным раком является нейробластома, глиобластома, медуллобластома, астроцитомы, меланома, мелкоклеточный рак легких, десмопластическая мелкокруглоклеточная фиброма, остеосаркома, рабдомиосаркома и/или другая саркома мягких тканей.

20. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом GD2-положительным раком является нейробластома.

21. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациенту был поставлен диагноз нейробластомы с высоким риском и/или нейробластомы 4-й стадии.

22. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациенту был поставлен диагноз минимальной остаточной болезни.

23. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом пациенту был поставлен диагноз рецидивирующей или рефрактерной болезни.

24. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 24 ч в сутки.

25. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточной дозе 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-50 или 1-60 мг/м².

26. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в суточной дозе 1-30, 1-35, 1-50 или 1-60 мг/м².

27. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в дозе 10, 20, 25, 50, 60, 65, 68, 70, 75, 80, 100, 120, 150, 200, 210, 250 или 300 мг/м²/цикл.

28. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится с помощью мини-насоса.

29. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом антитело против GD2 представлено антителом 14.18.

30. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом антитело против GD2 кодируется по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и/или 4 либо их фрагментов или гомологов с такой же или близкой к нативной качественной активностью.

31. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом антитело против GD2 представлено ch14.18/CHO или ch14.18/SP2/0.

32. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, представлен APN311.

33. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом антитело против GD2 представлено динутуксимаб (dinutuximab).

34. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий

антитело против GD2, вводится в дозе 7, 10, 15, 17,5, 20 или 25 мг/м²/день.

35. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится в течение 4, 5, 10, 14, 15 или 21 последовательных дней.

36. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, вводится на протяжении 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 или больше циклов лечения.

37. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, представлен APN311 и вводится в дозе 10 мг/м²/день в течение 10 последовательных дней на протяжении 6 или больше циклов лечения.

38. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом препарат, содержащий антитело против GD2, представлен ch14.18/SP2/0 и вводится в дозе 25, 20, 17,5 или 15 мг/м²/день в течение 4 последовательных дней на протяжении 5 или больше циклов лечения.

39. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом за периодом введения препарата, содержащего антитело против GD2, может следовать период введения изотретиноина или другого ретиноида.

40. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом введение препарата, содержащего антитело против GD2, сопровождается введением морфина и/или одного или нескольких других анальгетиков.

41. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом введение препарата, содержащего антитело против GD2, сопровождается введением пониженной дозы морфина и/или одного или нескольких других анальгетиков.

42. Препарат или способ по любому из предыдущих воплощений, при этом введение препарата, содержащего антитело против GD2, не сопровождается введением морфина и/или одного или нескольких других анальгетиков.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения GD2-положительного рака у пациента, включающий введение пациенту препарата, содержащего антитело ch14.18, без одновременного введения ИЛ-2 в пределах того же цикла лечения и/или в пределах того же общего времени лечения, причем антитело ch14.18 вводят пациенту в дозе от 1 до 25 мг/м²/сутки и от 50 до 150 мг/м²/цикл в виде непрерывного внутривенного вливания в течение 24 ч в сутки, при этом происходит лечение GD2-положительного рака.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий введение пациенту ретиноида в пределах того же самого цикла лечения перед, во время и/или после введения антитела ch14.18.

3. Способ по п.1 или 2, при этом антитело против GD2 представлено ch14.18/CHO или ch14.18/SP2/0.

4. Способ по любому из пп.1-3, при этом антитело против GD2 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи по SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4.

5. Способ по любому из пп.1-4, при этом препарат вводят пациенту в дозе 50, 60, 65, 68, 70, 75, 80, 100, 120 или 150 мг/м²/цикл.

6. Способ по любому из пп.1-5, при этом препарат вводят пациенту в суточной дозе 1-15 или 1-20 мг/м².

7. Способ по любому из пп.1-6, при этом препарат вводят пациенту в суточной дозе 7, 7,5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20 или 25 мг/м².

8. Способ по любому из пп.1-7, при этом препарат вводят пациенту в дозе 10 мг/м²/день в течение 10 последовательных дней или в дозе 15, 17,5, 20 или 25 мг/м²/день в течение 4 последовательных дней.

9. Способ по любому из пп.1-8, при этом антитело ch14.18 вводят пациенту на протяжении 2 или больше циклов лечения.

10. Способ по любому из пп.1-9, при этом пациент не получает одновременно GM-CSF в пределах того же самого цикла лечения и/или в пределах того же общего времени лечения.

11. Способ по любому из пп.1-10, при этом пациент не получает одновременно цитокин в пределах того же самого цикла лечения и/или в пределах того же общего времени лечения.

12. Способ по любому из пп.1-11, при этом пациент не получает ИЛ-2, и/или GM-CSF, и/или цитокин в пределах одного и того же цикла лечения и/или в пределах одного и того же общего времени лечения.

13. Способ по любому из пп.1-12, при этом GD2-положительным раком является нейробластома, глиобластома, медуллобластома, астроцитомы, меланома, мелкоклеточный рак легких, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, рабдомиосаркома и/или другая саркома мягких тканей.

14. Способ по любому из пп.1-13, при этом пациент страдает от первичной рефрактерной или рецидивирующей нейробластомы с высоким риском или от минимальной остаточной болезни при нейробластоме с высоким риском.

15. Способ по любому из пп.1-14, при этом суточная доза морфина, вводимая в течение одного или нескольких дней введения препарата, содержащего антитело ch14.18 в соответствии с изобретением,

и/или во все дни введения морфина будет ниже, чем суточная доза морфина при введении по схеме с IL-2, GM-CSF и/или другим цитокином.

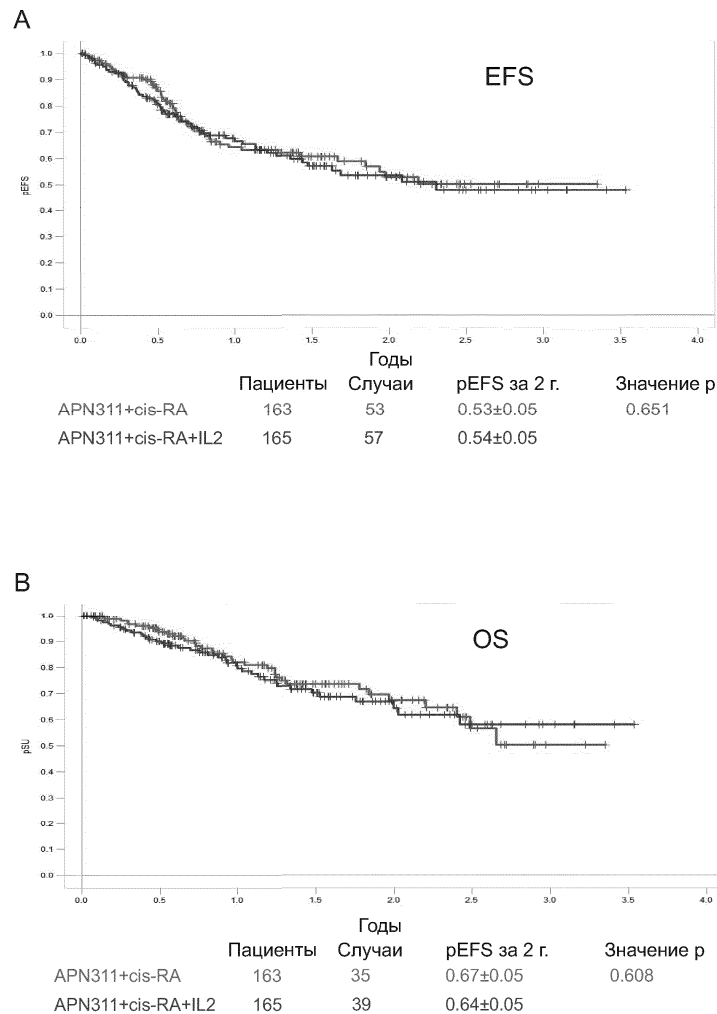
16. Способ по любому из пп.1-15, при этом морфин вводят только в некоторые, но не во все дни, в которые вводится препарат, содержащий антитело ch14.18.

17. Способ по любому из пп.1-16, при этом доза морфина за один цикл лечения, вводимая во время одного или нескольких циклов лечения, включающих введение препарата, содержащего антитело ch14.18 в соответствии с изобретением, будет ниже, чем доза морфина за один цикл лечения при введении по схеме с IL-2, GM-CSF и/или другим цитокином.

18. Способ по любому из пп.1-17, при этом доза морфина за все время лечения будет ниже, чем доза морфина за все время лечения при введении по схеме с IL-2, GM-CSF и/или другим цитокином.

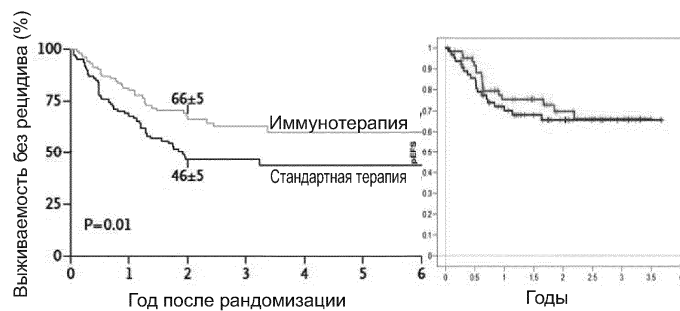
19. Способ по любому из пп.1-18, при этом снижается доза одного или нескольких анальгетиков, особенно морфина, в пределах общего времени лечения, в пределах одного цикла лечения, в период введения антитела в одном цикле лечения, от одного дня введения антитела до следующего дня введения антитела в одном цикле лечения и/или от одного цикла лечения к следующему.

20. Применение препарата, содержащего антитело ch14.18, в способе по любому из пп.1-19.

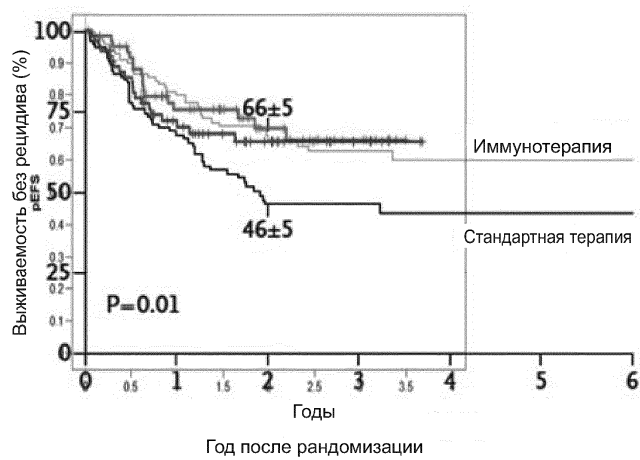


Фиг. 1

А

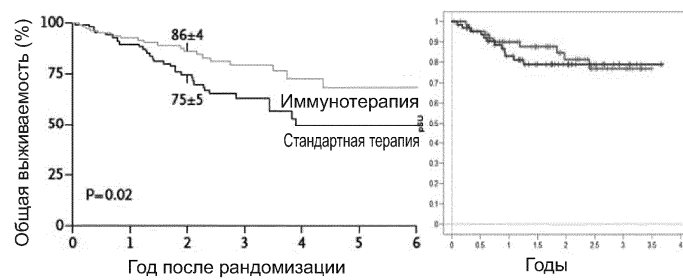


В

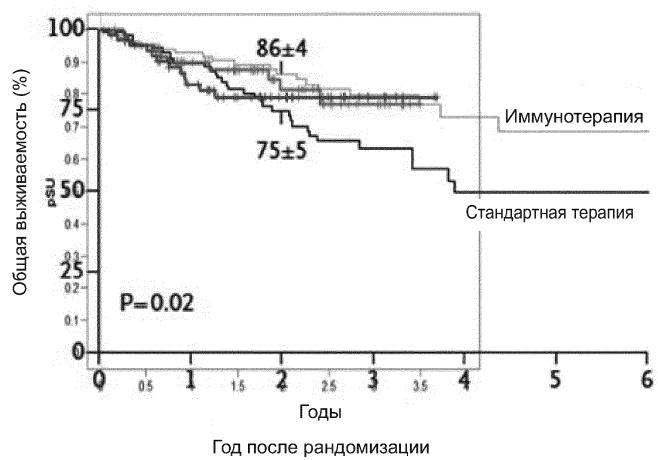


Фиг. 2

А



В



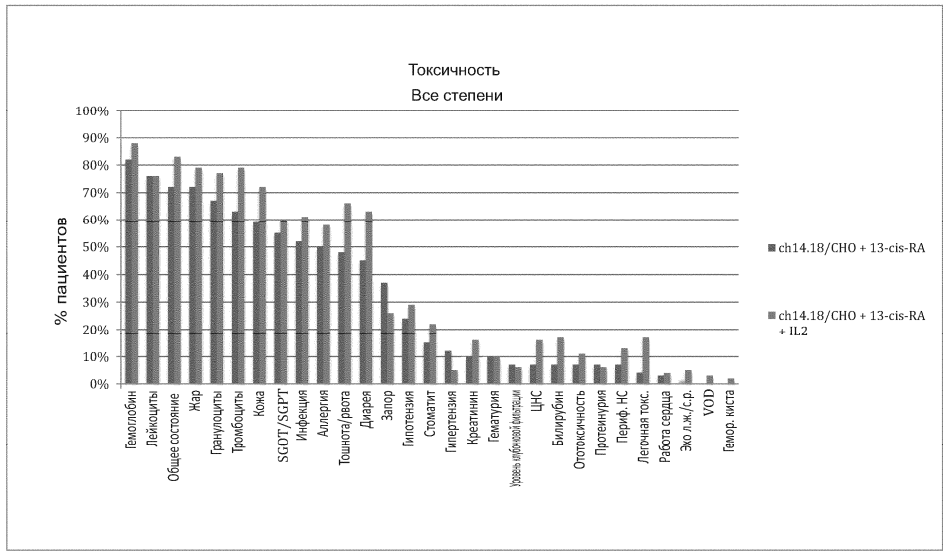
Фиг. 3

Токсичность	Все степени		3-4 степени	
	% пациентов ch14.18/CHO + 13-cis-RA	% пациентов ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	% пациентов ch14.18/CHO + 13-cis-RA	% пациентов ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2
Гемоглобин	82%	88%	39%	64%
Лейкоциты	76%	76%	28%	31%
Общее состояние	72%	83%	18%	40%
Жар	72%	79%	14%	37%
Гранулоциты	67%	77%	30%	48%
Тромбоциты	63%	79%	33%	59%
Кожа	59%	72%	5%	9%
SGOT/SGPT	55%	60%	14%	19%
Инфекция	52%	61%	25%	30%
Аллергия	50%	58%	8%	17%
Тошнота/рвота	48%	66%	4%	8%
Диарея	45%	63%	5%	20%
Запор	37%	26%	0%	2%
Гипотензия	24%	29%	7%	14%
Стоматит	15%	22%	2%	2%
Гипертензия	12%	5%	4%	0%
Креатинин	10%	16%	1%	1%
Гематурия	10%	10%	0%	0%
Уровень клубочковой фильтрации	7%	6%	2%	0%
ЦНС	7%	16%	2%	6%
Билирубин	7%	17%	2%	4%
Ототоксичность	7%	11%	2%	5%
Протеинурия	7%	6%	0%	0%
Периф. НС	7%	13%	1%	2%
Легочная токс.	4%	17%	2%	3%
Работа сердца	3%	4%	2%	2%
Эхо л.ж./с.р.	2%	5%	2%	1%
vod	1%	3%	0%	0%
Гемор. киста	0%	2%	0%	0%

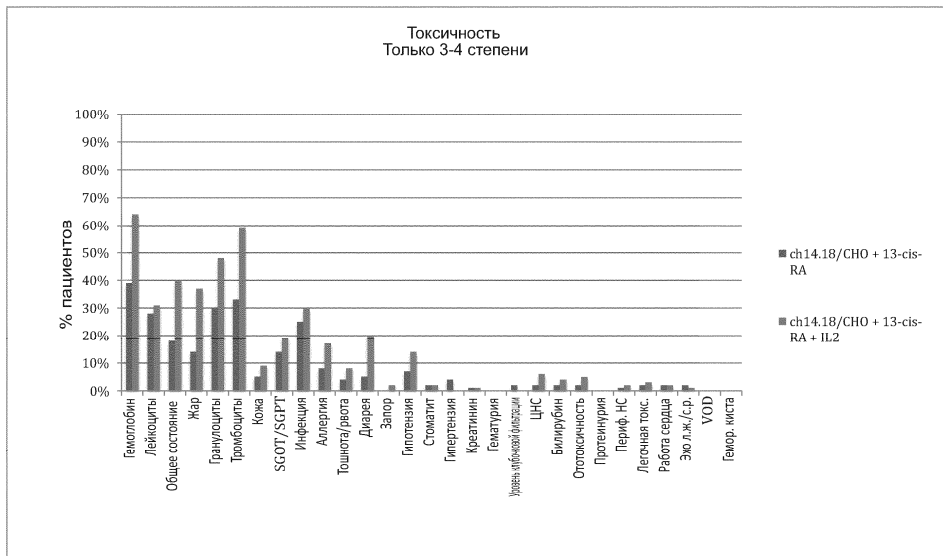
Фиг. 4

Токсичность	% пациентов											
	цикл 1		цикл 2		цикл 3		цикл 4		цикл 5		цикл 6	
	ch14.18/CHO + 13-cis-RA	ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	ch14.18/CHO + 13-cis-RA	ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	ch14.18/CHO + 13-cis-RA	ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	ch14.18/CHO + 13-cis-RA	ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	ch14.18/CHO + 13-cis-RA	ch14.18/CHO + 13-cis-RA + IL2	13-cis-RA (ch14.18/CHO treatment arm)	13-cis-RA (ch14.18/CHO + IL2 treatment arm)
Гемоглобин	78%	82%	82%	84%	76%	84%	73%	86%	66%	80%	57%	49%
Лейкоциты	66%	69%	66%	60%	54%	54%	40%	46%	32%	45%	12%	16%
Общее состояние	67%	83%	55%	74%	46%	72%	44%	62%	40%	62%	18%	31%
Жар	65%	77%	56%	77%	43%	72%	39%	69%	34%	67%	9%	12%
Гранулоциты	47%	60%	59%	69%	50%	72%	46%	65%	36%	61%	22%	31%
Тромбоциты	57%	73%	46%	73%	27%	63%	20%	57%	18%	61%	15%	19%
Кожа	47%	60%	35%	56%	33%	49%	35%	37%	28%	49%	13%	23%
sgot/sgpt	43%	48%	39%	53%	37%	58%	36%	49%	32%	54%	18%	31%
Инфекция	35%	44%	33%	35%	21%	33%	21%	27%	21%	32%	13%	18%
Аллергия	34%	45%	24%	43%	24%	36%	17%	28%	13%	29%	2%	3%
Тошнота/рвота	34%	49%	25%	41%	15%	42%	16%	29%	13%	31%	6%	7%
Диарея	28%	50%	24%	45%	16%	37%	12%	27%	12%	30%	8%	4%
Запор	18%	15%	17%	18%	12%	10%	11%	7%	9%	9%	5%	1%
Гипотензия	9%	16%	14%	18%	14%	19%	10%	9%	10%	9%	0%	0%
Стоматит	8%	12%	7%	11%	6%	10%	4%	7%	1%	9%	1%	2%
Гипертензия	9%	4%	6%	3%	3%	2%	3%	2%	3%	3%	1%	1%
Креатинин	6%	6%	2%	9%	2%	15%	5%	10%	5%	10%	4%	4%
Гематурия	7%	3%	8%	4%	3%	4%	3%	3%	2%	7%	1%	0%
Уровень клубочковой фильтрации	2%	1%	1%	1%	0%	2%	0%	3%	2%	3%	7%	6%
ЦНС	4%	10%	4%	6%	2%	7%	3%	3%	2%	1%	0%	1%
Билирубин	4%	9%	2%	8%	3%	9%	0%	6%	0%	5%	0%	1%
Ототоксичность	3%	0%	3%	6%	0%	9%	3%	0%	2%	3%	5%	13%
Протеинурия	3%	4%	7%	5%	1%	2%	1%	2%	2%	5%	0%	0%
Периф. НС	4%	9%	3%	4%	2%	5%	1%	2%	1%	7%	0%	2%
Легочная токс.	5%	14%	1%	5%	1%	8%	0%	3%	0%	4%	0%	2%
Работа сердца	2%	3%	0%	1%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Эхо л.ж./с.р.	1%	3%	0%	3%	1%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
vod	0%	2%	0%	3%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Гемор. киста	0%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

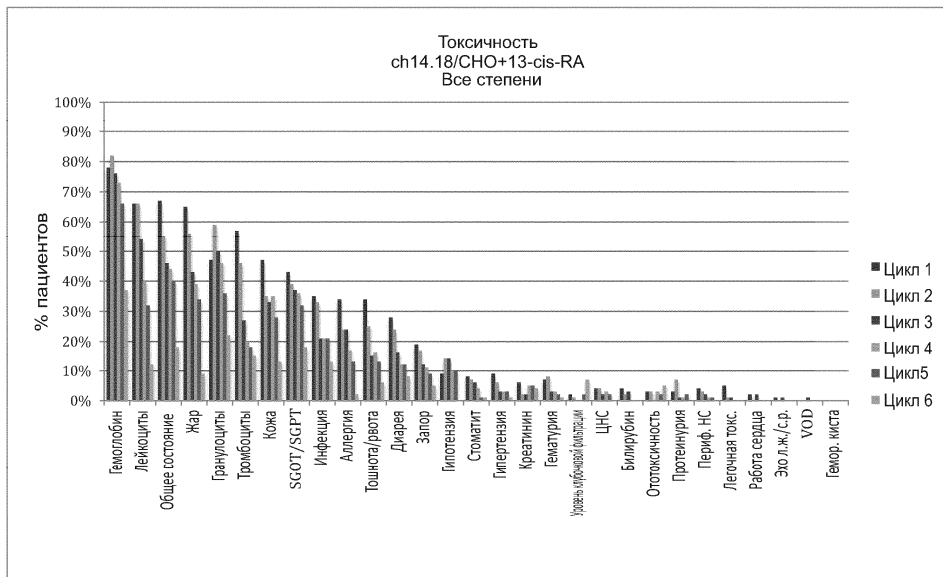
Фиг. 5



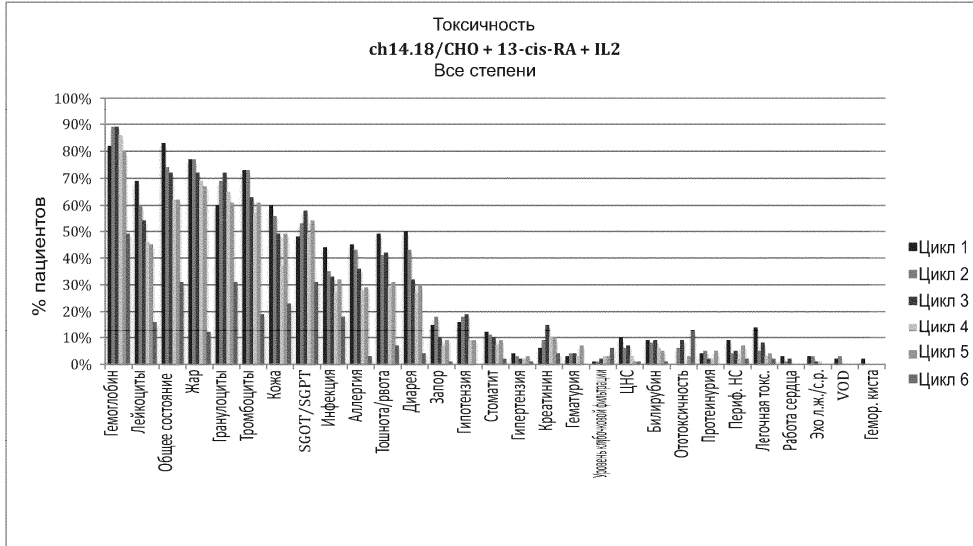
Фиг. 6



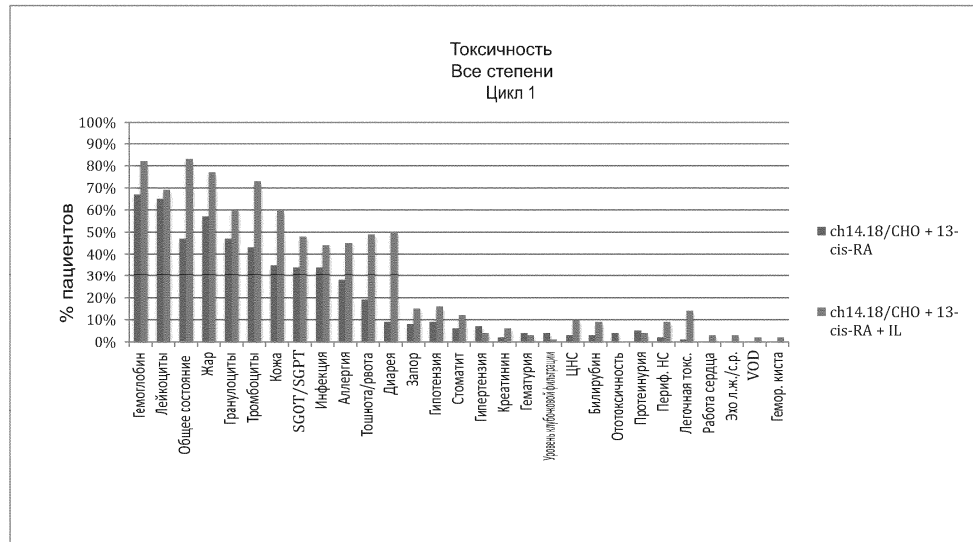
Фиг. 7



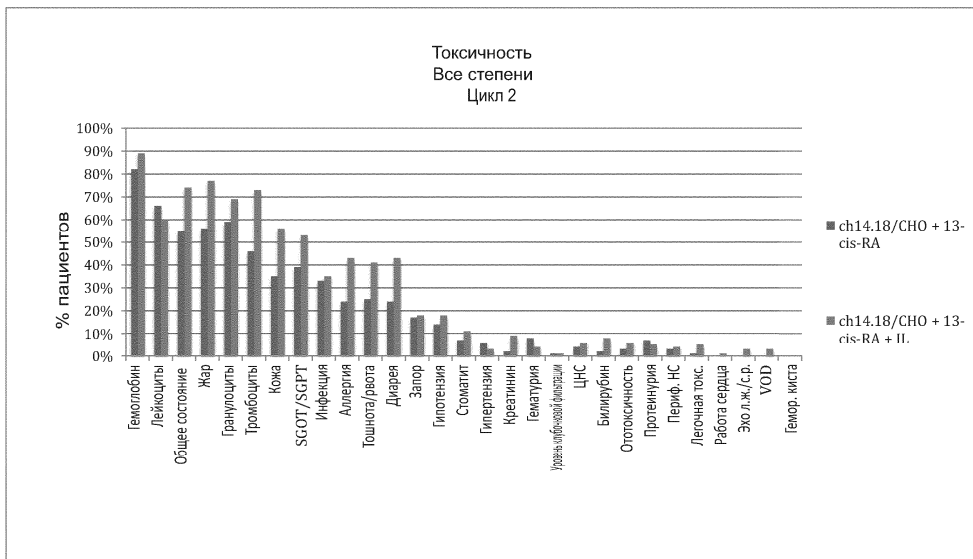
Фиг. 8



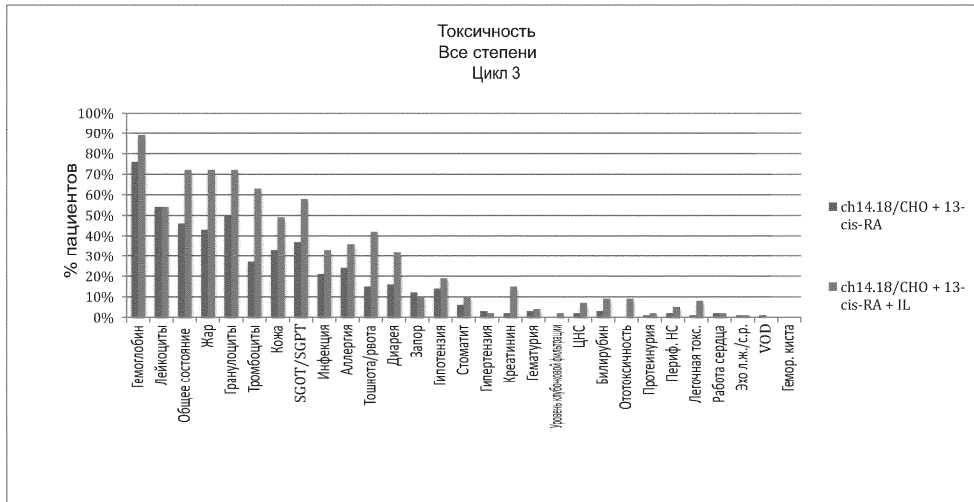
Фиг. 9



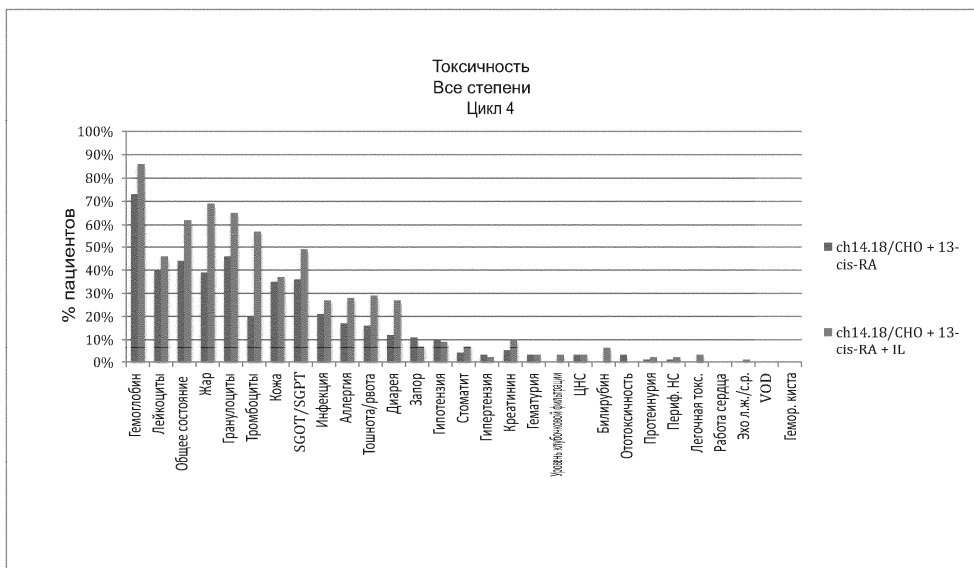
Фиг. 10



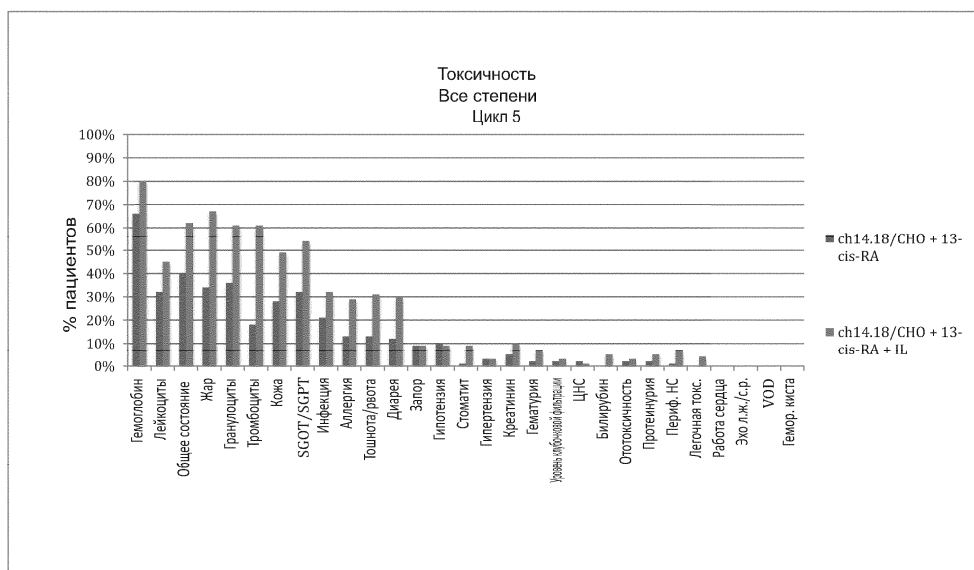
Фиг. 11



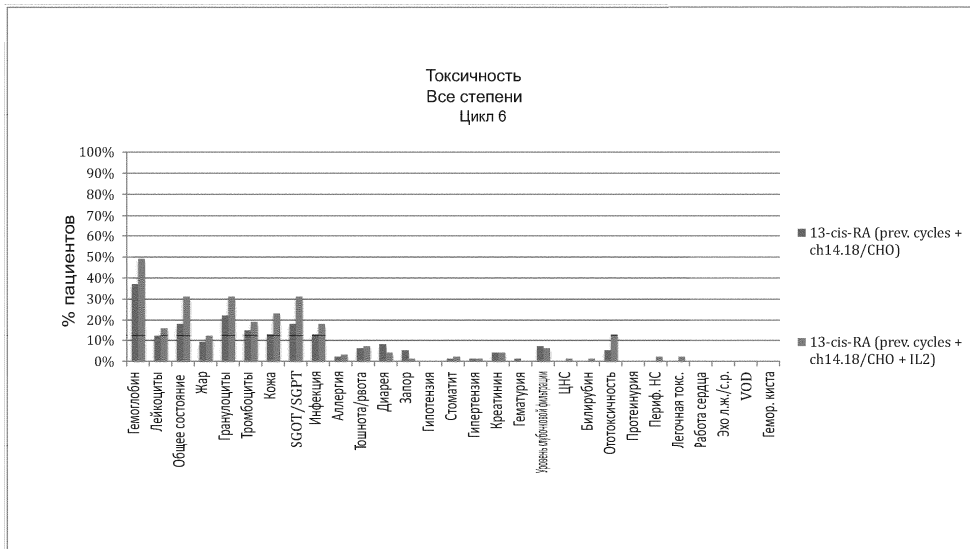
Фиг. 12



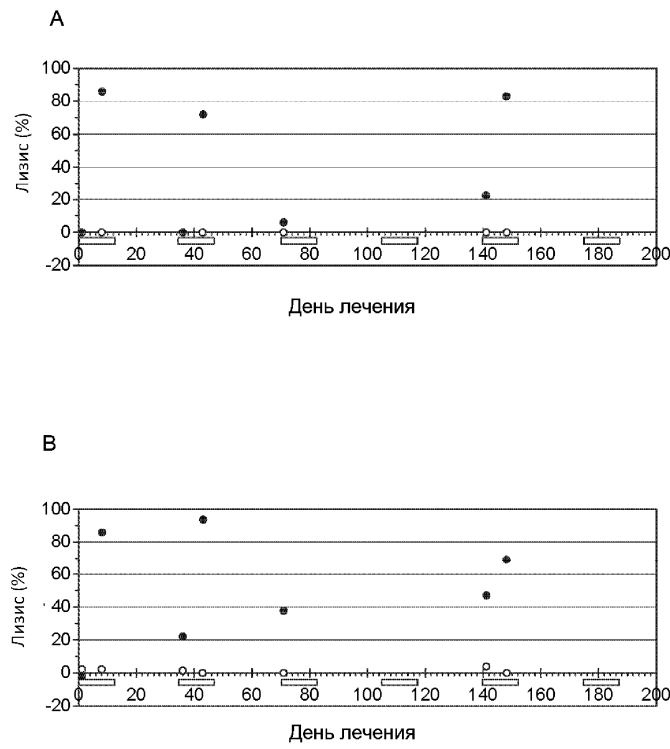
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

