

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790548 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.09.29

(51) Int. Cl. *A61P 35/04* (2006.01)
A61K 31/203 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.09.08

(54) ВАРИАНТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ АНТИ-CD38 АНТИТЕЛАМИ

(31) 62/047,877; 62/087,287

(32) 2014.09.09; 2014.12.04

(33) US

(86) PCT/US2015/048899

(87) WO 2016/040294 2016.03.17

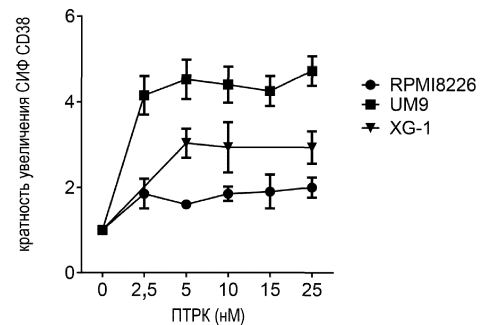
(88) 2016.06.02

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Локхорст Хенк М., Мютис Тюна,
Нейхоф Ингер С., Ван Де Донк Нилс
В. (NL)

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

(57) Настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии анти-CD38 антителами и полностью транс-ретиноевой кислотой.



201790548
A1

201790548

A1

ВАРИАНТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ АНТИ-CD38 АНТИТЕЛАМИ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии анти-CD38 антителами и полностью транс-ретиноевой кислотой.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Злокачественные В-клеточные опухоли включают хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, мантийноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, лимфому Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, первичную выпотную лимфому и СПИД-ассоциированную неходжкинскую лимфому. На долю злокачественных В-клеточных опухолей приходится более чем 85% диагностированных лимфом.

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную В-клеточную опухоль, характеризующуюся латентным накоплением секреторных плазмочитов в костном мозге с низким пролиферативным индексом и увеличенным жизненным циклом. Заболевание в конечном счете поражает кости и костный мозг, что приводит к появлению множественных опухолей и поражений во всей скелетной системе. Приблизительно 1% всех видов рака и немного более 10% всех гематологических злокачественных опухолей могут быть отнесены к ММ. Вероятность появления ММ повышается у людей старшего возраста, при этом средний возраст на момент диагностирования составляет 61 год.

CD38 представляет собой мембранный белок типа II, функцией которого является опосредованная рецепторами адгезия и сигнализация, а также опосредование мобилизации кальция посредством эктоферментативной активности, катализ образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из NAD^+ , а также гидролиз цАДФР в АДФ-рибозу (АДФР). CD38 опосредует секрецию цитокинов, а также активацию и пролиферацию лимфоцитов (Funaro *et al.*, *J Immunolog* 145:2390-6, 1990; Terhorst *et al.*, *Cell* 771-80, 1981; Guse *et al.*, *Nature* 398:70-3, 1999) и благодаря своей НАД-гликогидролазной активности регулирует уровни внеклеточного NAD^+ , который

задействован в модуляции компартмента регуляторных Т-клеток (Adriouch *et al.*, 14:1284-92, 2012; Chiarugi *et al.*, Nature Reviews 12:741-52, 2012).

CD38 экспрессируется на злокачественных плазмочитах ММ и задействован в различных гематологических злокачественных опухолях.

Доступные на данный момент варианты терапии ММ включают химиотерапию, трансплантацию стволовых клеток, таломид® (талидомид), ревлимид® (леналидомид), велкейд® (бортезомиб), аредиа® (памидронат) и зомету® (золедроновую кислоту). Результатом применения имеющихся на данный момент протоколов лечения, которые включают комбинацию химиотерапевтических агентов, таких как винкристин, БХНМ, мелфалан, циклофосфамид, адриамицин и преднизон или дексаметазон, является уровень полной ремиссии, составляющий только около 5%. Среднее время жизни с момента постановки диагноза составляет приблизительно 36-48 месяцев. Последние достижения с применением высоких доз химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных клеток костного мозга или моноклеарных клеток периферической крови повысили уровень полной ремиссии и длительность ремиссии, однако общая выживаемость была повышена не намного и не было получено сведений об излечении. В конечном итоге у всех пациентов с ММ наблюдался рецидив даже в случае применения поддерживающей терапии интерфероном-альфа (IFN- α), как одним, так и в комбинации со стероидами. Следовательно, существует необходимость в дополнительных вариантах терапии для лечения множественной миеломы и других злокачественных В-клеточных опухолей.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной

цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

фигура 1А иллюстрирует, что полностью транс-ретиноевая кислота (ПТРК) повышает экспрессию CD38 в клеточных линиях множественной миеломы (ММ) дозозависимым образом. Клеточные линии ММ RPMI8226, UM9 и XG1 инкубировали со средой RPMI-1640, одной или с 0-25 нМ ПТРК в течение 48 часов, а затем собирали, чтобы определить экспрессию CD38 методом проточной цитометрии. На графике представлены результаты по одному типовому эксперименту. По оси Y показана кратность увеличения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) для поверхностной экспрессии CD38.

фигура 1В иллюстрирует, что ПТРК повышает экспрессию CD38 в клеточных линиях ММ времязависимым образом. Клеточные линии ММ RPMI8226, UM9 и XG1 инкубировали со средой RPMI-1640, одной или с 10 нМ ПТРК в течение 24, 48, 72 или 96 часов, а затем собирали, чтобы определить экспрессию CD38 методом проточной цитометрии. На графике представлены результаты по одному типовому эксперименту. По оси Y показана кратность увеличения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) для поверхностной экспрессии CD38.

фигура 2 иллюстрирует, что ПТРК повышает экспрессию CD38 на мононуклеарных клетках костного мозга (МНК-КМ), полученных от пациентов с ММ *ex vivo*. МНК-КМ от 26 пациентов с ММ инкубировали со средой RPMI-1640, одной или с 10 нМ ПТРК в течение 48 часов, а затем собирали, чтобы определить экспрессию CD38 методом проточной цитометрии. По оси Y показана СИФ для поверхностной экспрессии CD38. Среднее: среднее в 0 часов. нс: не существенно.***p<0,001; ****p<0,0001.

фигура 3А иллюстрирует даратумумаб-индуцированную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) (верхняя панель) и антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) (нижняя панель) в клеточной линии ММ XG1, предварительно обработанной с или без 10 нМ ПТРК в течение 48 часов перед реализацией КЗЦ или АЗКЦ в присутствии 10 мкг/мл даратумумаба. По

оси Y показан процент (%) КЗЦ или АЗКЦ. Данные показывают среднее и СОС, по меньшей мере, по трем экспериментам. р-значения между указанными группами рассчитывали, используя парный t-критерий Стьюдента. Дара: даратумумаб; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

фигура 3В иллюстрирует даратумумаб-индуцированную КЗЦ (верхняя панель) и АЗКЦ (нижняя панель) в клеточной линии MM RPMI8226, предварительно обработанной с или без 10 нМ ПТРК в течение 48 часов перед реализацией КЗЦ или АЗКЦ в присутствии 10 мкг/мл даратумумаба. По оси Y показан процент (%) КЗЦ или АЗКЦ. Данные показывают среднее и СОС, по меньшей мере, по трем экспериментам. Р-значения между указанными группами рассчитывали, используя парный t-критерий Стьюдента. Дара: даратумумаб; нс: не существенно.

фигура 3С иллюстрирует даратумумаб-индуцированную КЗЦ (верхняя панель) и АЗКЦ (нижняя панель) в клеточной линии MM UM9, предварительно обработанной с или без 10 нМ ПТРК в течение 48 часов перед реализацией КЗЦ или АЗКЦ в присутствии 10 мкг/мл даратумумаба. По оси Y показан процент (%) КЗЦ или АЗКЦ. Данные показывают среднее и СОС, по меньшей мере, по трем экспериментам. Р-значения между указанными группами рассчитывали, используя парный t-критерий Стьюдента. Дара: даратумумаб; * $p < 0,05$; нс: не существенно.

фигура 4А иллюстрирует, что предварительная обработка первичных клеток MM в течение 48 часов 10 нМ ПТРК усиливает даратумумаб-индуцированную КЗЦ первичных клеток MM. Клетки MM предварительно обрабатывали в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 0-10 мкг/мл. На графике представлены объединенные результаты по образцам 16 пациентов. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. ДАРА: даратумумаб.

фигура 4В иллюстрирует, что предварительная обработка первичных клеток MM в течение 48 часов 10 нМ ПТРК усиливает даратумумаб-индуцированную АЗКЦ первичных клеток MM. Клетки MM предварительно обрабатывали в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 0-10 мкг/мл. На графике представлены объединенные

результаты по образцам 13 пациентов. * $p < 0,05$. ДАРА: даратумумаб.

Фигура 5А иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 1 и пациента 2, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5В иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 3 и пациента 4, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5С иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 5 и пациента 6, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5D иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 7 и пациента 8, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5Е иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 9 и пациента 10, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5F иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 11 и пациента 12, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5G иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 13 и пациента 14, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации

даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 5H иллюстрирует результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 15 и пациента 16, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6A иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 3 и пациента 4, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6B иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 7 и пациента 8, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6C иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 9 и пациента 10, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6D иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 14 и пациента 15, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6E иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 16 и пациента 17, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

Фигура 6F иллюстрирует результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 18, предварительно обработанных в течение 48 часов с или без 10 нМ ПТРК, как указано на Фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл.

фигура 7 иллюстрирует уровни экспрессии CD38 в МНК-КМ, выделенных из организма пациентов с ММ, до и после инкубации клеток с (черные столбики) или без (белые столбики) 10 нМ ПТРК. Те же полученные от пациентов образцы использовали в анализе АЗКЦ и КЗЦ, как показано на Фигурах 4А, 4В, 5 и 6.

фигура 8А иллюстрирует ПТРК-индуцированное снижение экспрессии CD55, CD59 и CD46 на клетках RPMI8226 после 48 часов инкубации клеток с 0-25 нМ ПТРК. СИФ; средняя интенсивность флуоресценции. Экспрессию CD55, CD59 и CD46 оценивали с помощью проточной цитометрии. Верхняя панель: СИФ; нижняя панель: Кратность изменения СИФ по сравнению с контролем.

фигура 8В иллюстрирует ПТРК-индуцированное снижение экспрессии CD55, CD59 и CD46 на клетках UM9 после 48 часов инкубации клеток с 0-25 нМ ПТРК. СИФ; средняя интенсивность флуоресценции. Экспрессию CD55, CD59 и CD46 оценивали с помощью проточной цитометрии. Верхняя панель: СИФ; нижняя панель: Кратность изменения СИФ по сравнению с контролем.

фигура 8С иллюстрирует ПТРК-индуцированное снижение экспрессии CD55, CD59 и CD46 на клетках XG1 после 48 часов инкубации клеток с 0-25 нМ ПТРК. СИФ; средняя интенсивность флуоресценции. Экспрессию CD55, CD59 и CD46 оценивали с помощью проточной цитометрии. Верхняя панель: СИФ; нижняя панель: Кратность изменения СИФ по сравнению с контролем.

фигура 9А иллюстрирует ПТРК-индуцированное снижение экспрессии CD55 на первичных клетках ММ после 48 часов инкубации клеток с (серые столбики) или без (черные столбики) 10 нМ ПТРК, как указано. * $p=0,019$.

фигура 9В иллюстрирует ПТРК-индуцированное снижение экспрессии CD59 на первичных клетках ММ после 48 часов инкубации клеток с (серые столбики) или без (черные столбики) 10 нМ ПТРК, как указано. ** $p=0,0047$.

фигура 9С иллюстрирует влияние ПТРК на экспрессию CD46 на первичных клетках ММ после 48 часов инкубации клеток с (серые столбики) или без (черные столбики) 10 нМ ПТРК, как указано. нс: не существенно.

фигура 10А иллюстрирует экспрессию CD55 на первичных

клетках ММ, выделенных из организма 16 пациентов с ММ, после 48 часов инкубации клеток с (черные столбики) или без (белые столбики) 10 нМ ПТРК. Те же полученные от пациентов образцы использовали в анализе КЗЦ, как показано на Фигуре 5.

Фигура 10В иллюстрирует экспрессию CD59 на первичных клетках ММ, выделенных из организма 16 пациентов с ММ, после 48 часов инкубации клеток с (черные столбики) или без (белые столбики) 10 нМ ПТРК. Те же полученные от пациентов образцы использовали в анализе КЗЦ, как показано на Фигуре 5.

Фигура 10С иллюстрирует экспрессию CD46 на первичных клетках ММ, выделенных из организма 16 пациентов с ММ, после 48 часов инкубации клеток с (черные столбики) или без (белые столбики) 10 нМ ПТРК. Те же полученные от пациентов образцы использовали в анализе КЗЦ, как показано на Фигуре 5.

Фигура 11 иллюстрирует, что ПТРК улучшает ответ на даратумумаб в гуманизированной мышинной модели множественной миеломы. Мышей Rag2^{-/-}γc^{-/-}, несущих структуры, покрытые мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), инокулировали трансдуцированными люциферазой клетками XG1. Мышей обрабатывали контролем, ПТРК плюс без-T-клеточными МКПК в качестве эффекторных клеток (МКПК-T), даратумумабом плюс МКПК-T или даратумумабом плюс ПТРК плюс МКПК-T и еженедельно обследовали методом биолюминесцентной визуализации (БЛВ) в отношении роста трансдуцированных клеток XG1. На Фигуре проиллюстрирована опухолевая нагрузка, приходящаяся на обрабатываемую группу, с 4 мышами на группу и 4 структурами на каждую мышь. Статистическую разницу между мышами, обрабатываемыми даратумумабом, и мышами, обрабатываемыми даратумумабом плюс ПТРК, рассчитывали, используя U-критерий Манна-Уитни. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001; нс: не существенно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин «CD38» относится к белку CD38 человека (синонимы: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФ гидролаза 1, циклическая АДФ-рибоза-гидролаза 1). Человеческий CD38 имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1

В контексте данного документа «антитела» имеют широкое значение и включают молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, в том числе мышьиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела и одноцепочечные антитела.

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

В контексте данного документа «фрагменты антител» относятся к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, фрагмент F(ab)₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области, фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, доменное антитело (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341:544- 546, 1989), которое состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкциями антител, с образованием моновалентного антигенсвязывающего

сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

В контексте данного документа «выделенное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, которое в значительной мере свободно от других антител, имеющих разную антигенную специфичность (например, антитела, которое специфически связывает CD38). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с CD38, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как ортологи человеческого CD38, например CD38 *Macaca fascicularis* (яванского макака). Более того, выделенное антитело может быть в значительной степени свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Вариабельная область антитела состоит из «каркасной» области, разделенной тремя «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определены с использованием различных терминов: Определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательностей (Wu and Kabat J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); «Гипервариабельные области», «HVR» или «HV», три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям вариабельных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987). Другие термины включают IMGT-CDR (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) и «использование остатков, определяющих специфичность» (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_imgt_org) представлена стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между

разграничениями CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc *et al.*, *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003.

При использовании в настоящем документе термин «остатки по Chothia» означает остатки VL и VH антител с нумерацией по Al-Lazikani (Al-Lazikani *et al.*, *J Mol Biol* 273:927-48, 1997).

«Каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой остаточные последовательности переменной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты.

Термин «гуманизованное антитело» относится к антителу, в котором антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, а каркасы переменной области получены из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Гуманизованные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не являться точной копией экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или генных последовательностей зародышевой линии.

Термин «адаптированные для человека» антитела или «адаптированные для человеческого каркаса (HFA)» антитела относится к гуманизованным антителам, адаптированным по способам, описанным в патентной публикации США № US2009/0118127. Адаптированные для человека антитела гуманизируют путем выбора человеческих каркасов-акцепторов на основе максимальных сходств CDR и FR, совместимости длин и сходств последовательностей петель CDR1 и CDR2 и части петель CDR3 легкой цепи.

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

Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой или легкой цепей, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, где переменные области антитела получены из системы, в которой применяется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перераспределенные гены

иммуноглобулина. Такие системы включают библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши, несущих локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. «Человеческое антитело» может содержать аминокислотные отличия по сравнению с человеческой зародышевой линией или перераспределенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, человеческое антитело по аминокислотной последовательности, по меньшей мере, на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik *et al.*, J Mol Biol 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаге, например, как описано в публикации Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

Выделенные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Человеческие антитела могут быть созданы с помощью систем, таких как фаговый дисплей, содержащих синтетические CDR и/или синтетические каркасные области, или могут быть подвержены *in vitro* мутагенезу для улучшения свойств антитела.

В контексте данного документа «рекомбинантное антитело» включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из организма животного (например, мыши или крысы),

являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или полученные из него гибридомы (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* путем обмена плеч Fab, такие как биспецифические антитела.

В контексте данного документа «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антител одномолекулярной композиции. Композиция моноклональных антител демонстрирует одинарную специфичность связывания посредством VH, VL и/или пары VH/VL и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам.

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

В контексте данного документа «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от стандартного полипептида или стандартного полинуклеотида одной или более модификациями, например, заменой, вставкой или делецией.

Термины «синергия», «синергизм» или «синергетический»

означают эффект комбинации, превышающий ожидаемый аддитивный эффект.

В контексте данного документа «в комбинации с» означает, что два или более терапевтических средства можно вводить субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно происходить замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, или которое обеспечивает благоприятный или желаемый клинический результат во время лечения заболевания, такого как развитие, рост или распространение опухоли или опухолевых клеток. Благоприятные или желательные клинические результаты включают ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. Нуждающиеся в лечении включают субъекты, уже имеющие нежелательное физиологическое изменение или заболевание, а также субъекты, склонные к развитию нежелательного физиологического изменения или заболевания.

«Ингибирует рост» (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) относится к измеримому снижению роста клеток *in vitro* или *in vivo* при приведении в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических или лекарственных средств по сравнению с ростом тех же клеток, растущих в соответствующих контрольных условиях, хорошо известных специалистам в данной области. Ингибирование роста клетки *in vitro* или *in vivo* может составлять, по меньшей мере, около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 100%. Ингибирование роста клеток может происходить в соответствии с разнообразными механизмами, например, за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ),

антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), апоптоза, некроза или ингибирования пролиферации клеток.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

В изобретении предложены способы лечения пациентов с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью комбинацией антитела к CD38 и полностью транс-ретиноевой кислоты (ПТРК). Изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что ПТРК усиливает опосредованный анти-CD38 антителом даратумумабом лизис посредством АЗКЦ и/или КЗЦ первичных клеток ММ, экспрессирующих низкие, средние и высокие уровни CD38, путем повышения экспрессии CD38 на клетках ММ. ПТРК также способна индуцировать даратумумаб-опосредованную АЗКЦ и/или КЗЦ в первичных образцах ММ, которые были устойчивы к даратумумаб-опосредованной КЗЦ и/или АЗКЦ *in vitro* или были получены от прошедших сильное лечение пациентов с множественной миеломой, имеющих вдвойне рефрактерное (рефрактерное к леналидомиду и бортезомибу) заболевание. ПТРК усиливала даратумумаб-опосредованную КЗЦ в большей степени, чем АЗКЦ, что можно объяснить тем, что ПТРК также осуществляет понижающую регуляцию комплемент-ингибиторных белков CD55 и CD59.

ПТРК (CAS 302-79-4) имеет хорошо известную молекулярную структуру.

Один вариант реализации раскрытого в данном документе

изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

Один вариант реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

Способы в соответствии с изобретением можно применять для лечения субъекта-животного в рамках любой классификации. К примерам таких животных относятся млекопитающие, такие как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

В некоторых вариантах реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством КЗЦ *in vitro*.

«CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль» относится к гематологической злокачественной опухоли, которая характеризуется наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, включая лейкозы, лимфомы и миелому. Примерами таких CD38-положительных гематологических злокачественных опухолей являются В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома из клеток-предшественников и В-клеточная неходжкинская лимфома, острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и новообразования из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточный острый лимфоцитарный

лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома (МКЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), включая высокодифференцированную, умеренно дифференцированную и низкодифференцированную ФЛ, кожная лимфома из клеток центра фолликула, В-клеточная лимфома маргинальной зоны (типа MALT, узловая и селезеночная), лейкоз ворсистых клеток, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ), лимфома Беркитта (BL), плазмочитома, множественная миелома (ММ), плазмочитарный лейкоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемия Вальденстрема, плазмочитарные лейкозы и анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ).

CD38 экспрессируется при разнообразных злокачественных гематологических заболеваниях, включая множественную миелому, лейкозы и лимфомы, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, Т- и В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, макроглобулинемия Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, мантийноклеточная лимфома, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лейкоз из больших зернистых лейкоцитов (БЗЛ), лейкоз из NK-клеток и плазмочитарный лейкоз. Была описана экспрессия CD38 на эпителиальных/эндотелиальных клетках различного происхождения, включая железистый эпителий простаты, островковые клетки поджелудочной железы, протоковый эпителий желез, включая околоушную железу, бронхиальные эпителиальные клетки, клетки яичек и яичников и эпителий опухоли колоректальной аденокарциномы. Другие заболевания, во время которых может наблюдаться экспрессия CD38, включают, например, бронхоэпителиальные карциномы легкого, рак молочной железы (развивающийся в результате злокачественной пролиферации эпителиальной выстилки в протоках и долях молочной железы), опухоли поджелудочной железы, развивающиеся из β -клеток (инсулиномы), опухоли, развивающиеся из эпителия в кишечнике (например, аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома), карцинома

в предстательной железе и семиномы в яичках, а также раковые заболевания яичников. В центральной нервной системе CD38 экспрессируется нейробластомами.

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ).

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому.

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому (ФЛ).

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому Беркитта (ЛБ).

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый

лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

Примеры В-клеточных неходжкинских лимфом представляют собой лимфогранулематоз, первичную выпотную лимфому, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, средостенную В-крупноклеточную лимфому, заболевания тяжелых цепей (включая γ -, μ - и α -цепи), лимфомы, индуцированные терапией иммуносупрессорными средствами, такие как лимфома, вызванная циклоспорином, и лимфома, вызванная метатрексатом.

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, расстройство, связанное с клетками, экспрессирующими CD38, представляет собой лимфому Ходжкина.

Другие примеры расстройств, связанных с CD38-экспрессирующими клетками, включают злокачественные опухоли из Т- и NK-клеток, включая: новообразования из зрелых Т-клеток и NK-клеток, включая Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, агрессивный лейкоз NK-клеток, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому назального типа, энтеропатийную Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, подкожную панникулит-подобную Т-клеточную лимфому, бластную NK-клеточную лимфому, фунгоидную гранулему/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные Т-клеточные лимфопролиферативные расстройства (первичную кожную анапластическую крупноклеточную лимфому К-АККЛ, лимфоматоидный папулез, пограничные очаги), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, периферическую неспецифическую Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому.

Примеры злокачественных заболеваний, связанных с миелоидными клетками, включают в себя острый миелоидный лейкоз, включая острый промиелоцитарный лейкоз, и хронические миелолиферативные заболевания, включая хронический миелоидный лейкоз.

В способах согласно раскрытому в данном документе

изобретению, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, можно применять любое анти-CD38 антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD38 антитело индуцирует *in vitro* уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

Вариабельные области анти-CD38 антител можно получить из существующих анти-CD38 антител и клонировать в виде полноразмерных антител или в различные форматы антител с помощью стандартных способов. Типовые вариабельные области, связывающие CD38, которые можно применять, описаны в международных патентных публикациях №№ WO05/103083, WO06/125640, WO07/042309, WO08/047242, WO12/092612, WO06/099875 и WO11/154453A1.

Примером анти-CD38 антитела, которое можно применять, является даратумумаб. Даратумумаб содержит аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), приведенные в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, имеет подтип IgG1/κ и описан в патенте США № 7829693. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи даратумумаба показана в SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 1

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLLVVLAVVVPRWRQOWSGPGTTRKRPETVLARCVKYTEIH
PEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHOFTQVQVQDMFTLEDTLLGYLA
DDLWTWCGEFNTSKINYQSCPDRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGRSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEK
VQTFLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIOFSCNKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIOFSCNKNIYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTFLEAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA

ISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVF

DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR

FSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQORSNWPPTFGOGTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEPVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QORSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY

YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGLVTVSSA

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSL

SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP

ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQORSNWPPTFGOGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE

QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Другим типовым анти-CD38 антителом, которое можно применять, является mAb003, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США № 7829693. VH

и VL mAb003 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 14

OVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAFSWVROAPGOGLEWMGRVIPFLGIAN
SAQKFOGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPFDYWGQGLTVTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNSYPRTFGQGTKVEIK

Другим типовым анти-CD38 антителом, которое можно применять, является mAb024, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, описанное в патенте США № 7829693. VH и VL mAb024 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVROMPGKLEWMGI IYPHDS DAR
YSPSFQGVTF SADKSISTAYLOWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVTVSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQORSNWPPTFGQGTKVEIK

Другим типовым анти-CD38 антителом, которое можно применять, является MOR-202 (MOR-03087), содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно, описанные в патенте США № 8088896. VH и VL MOR-202 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 18

OVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVROAPGKLEWVSGISGDPSNTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAWYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGOTARISCSGDNLRHYYVYWYQOKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ

Другим типовым анти-CD38 антителом, которое можно применять, является изатуксимаб, содержащий последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно, описанный в патенте США № 8153765. VH и VL изатуксимаба могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 20:

OVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKORPGGLEWIGTIYPGDGDTG

YAOQFOGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYSNSLDYWGOGTSVTVSS

SEQ ID NO: 21:

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQOKPGQSPRRLIYSASYRYIGVP
DRFTGSGAGTDFTFITISSVQAEDLAVYYCQOHYSPPYTFGGGGTKLEIK

Другие типовые анти-CD38, которые можно применять в способах согласно изобретению, включают антитела, описанные в международной патентной публикации № WO05/103083, международной патентной публикации № WO06/125640, международной патентной публикации № WO07/042309, международной патентной публикации № WO08/047242 или международной патентной публикации № WO14/178820.

Анти-CD38 антитела, применяемые в способах согласно раскрытому в данном документе изобретению, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, могут также быть выбраны *de novo* из библиотеки фагового дисплея, где фаг сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать человеческие иммуноглобулины или их части, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные переменные области антител (Knappik *et al.*, J Mol Biol 296:57-86, 2000; Krebs *et al.*, J Immunol Meth 254:67-84, 2001; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets *et al.*, PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks *et al.*, J Mol Biol 222:581, 1991). Переменные домены, связывающие CD38, можно выделить, например, из библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих переменные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде белков, слитых с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в Shi *et al.*, J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и в международной публикации РСТ № WO09/085462). Можно проводить скрининг библиотек антител в отношении связывания с внеклеточным доменом человеческого CD38, дополнительно характеризовать полученные положительные клоны, из лизатов клонов выделять Fab и впоследствии клонировать в виде полноразмерных антител. Такое применение способов фагового дисплея для выделения человеческих антител принято в данной области техники. См., например: патент США № 5223409; патент США № 5 403 484; а также патент США № 5571698, патент США № 5427908, патент США № 5580717,

патент США № 5969108, патент США № 6172197, патент США № 5885793; патент США № 6 521 404; патент США № 6 544 731; патент США № 6 555 313; патент США № 6 582 915; и патент США № 6593081.

Fc-область антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) или комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ). Такие функции могут быть опосредованы связыванием эффекторного(ых) Fc-домена(ов) с Fc-рецептором на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или связыванием эффекторного(ых) Fc-домена(ов) с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредованный(ые) Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводят к ингибированию и/или истощению популяции клеток-мишеней, например, CD38-экспрессирующих клеток. Изоотипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 проявляют разную способность в отношении эффекторных функций. АЗКЦ может быть опосредована IgG1 и IgG3, АЗКФ может быть опосредован IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а КЗЦ может быть опосредована IgG1 и IgG3.

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело имеет изоотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело имеет изоотип IgG1 или IgG3.

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело индуцирует *in vitro* уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ.

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело индуцирует *in vitro* уничтожение CD38-экспрессирующих клеток

посредством КЗЦ.

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ и КЗЦ *in vitro*.

«Антителозависимая клеточная цитотоксичность», или «антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность», или «АЗКЦ» представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например, естественными клетками-киллерами, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством Fc-гамма-рецепторов (Fc γ R), экспрессируемых на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют Fc γ RIIIa, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIIIa. Гибель покрытых антителами клеток-мишеней, таких как CD38-экспрессирующие клетки, происходит в результате активности эффекторных клеток посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки АЗКЦ-активности анти-CD38 антитела *in vitro* антитело можно добавлять к CD38-экспрессирующим клеткам в комбинации с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. В общем случае цитолиз обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков). Например, для анализа можно использовать первичные клетки МНК-КМ, выделенные из организма пациента со злокачественной В-клеточной опухолью. В типовом анализе МНК-КМ можно обрабатывать в течение 1 часа анти-CD38 антителом в концентрации 0,3-10 мкг/мл, а выживаемость первичных CD138⁺ клеток ММ можно определить методом проточной цитометрии, применяя технологию, описанную в van der Veer *et al.*, Haematologica 96:284-290, 2001 или в van der Veer *et al.*, Blood Cancer J 1(10):e41, 2011. Процентную долю лизиса клеток ММ можно определять по сравнению с изотипическим контролем, как описано в

данном документе. Анти-CD38 антитела, применяемые в способах согласно изобретению, могут индуцировать АЗКЦ на уровне около 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от контроля.

«Комплементзависимая цитотоксичность» или «КЗЦ», относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный Fc-домен связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который в свою очередь активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к депонированию компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, что облегчает АЗКЦ за счет связывания на лейкоцитах рецепторов комплемента (например, CR3). В типовом анализе первичные клетки МНК-КМ, выделенные из организма пациента со злокачественной В-клеточной опухолью, можно обрабатывать в течение 1 часа анти-CD38 антителом и комплементом, полученным из 10% пула человеческой сыворотки, в концентрации 0,3-10 мкг/мл, а выживаемость первичных CD138⁺ клеток ММ можно определить методом проточной цитометрии, применяя технологию, описанную в van der Veer *et al.*, *Haematologica* 96:284-290, 2011; van der Veer *et al.*, *Blood Cancer J* 1(10):e41, 2011. Процентную долю лизиса клеток ММ можно определять по сравнению с изотипическим контролем, как описано в данном документе. Анти-CD38 антитела, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать КЗЦ на уровне около 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

Способность моноклональных антител индуцировать АЗКЦ можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. Человеческие IgG1 или IgG3 являются N-гликозилированными в Asn297 с большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, вырабатываемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к Fc-областям, усиливает АЗКЦ антител посредством

улучшения связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или КЗЦ-активности. Такие антитела можно получать различными способами, которые, по имеющимся данным, приводят к экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, таких как регулирование осмоляльности культуральной среды (Konno *et al.*, *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение вариантной линии CHO Lec13 в качестве клеточной линии-хозяина (Shields *et al.*, *J Biol Chem* 277:26733-40, 2002), применение вариантной линии клеток CHO EB66 в качестве клеточной линии-хозяина (Olivier *et al.*, *MAbs*;2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве клеточной линии-хозяина (Shinkawa *et al.*, *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α 1,6-фукозилтрансферазы (*FUT8*) (Mori *et al.*, *Biotechnol Bioeng*88:901-908, 2004), или коэкспрессия β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara *et al.*, *J Biol Chem*281:5032-5036, 2006, Ferrara *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008). АЗКЦ, вызываемая анти-CD38 антителами, применяемыми в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6737056. КЗЦ, вызываемая анти-CD38 антителами, применяемыми в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 423, 268, 267 и/или 113 (нумерация

остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в Moore et al., Mabs 2:181-189, 2010.

В некоторых описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитела содержат замену в Fc антитела.

В некоторых описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитела содержат замену в Fc антитела в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 и/или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС).

В некоторых описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитела содержат замену в Fc антитела в аминокислотных позициях 113, 267, 268 и/или 423 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС).

Другой вариант реализации изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

Другой вариант реализации изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или

комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), причем анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

Антитела можно оценивать в отношении их конкуренции с даратумумабом, имеющим VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в отношении связывания CD38, используя хорошо известные *in vitro* способы. В типовом способе клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие CD38, можно инкубировать с немеченым даратумумабом в течение 15 мин при 4 °C с последующей инкубацией с избытком флуоресцентно меченного исследуемого антитела в течение 45 мин при 4 °C. После промывки в ФСБ/БСА можно проводить измерение флуоресценции с помощью проточной цитометрии, используя стандартные методы. В другом типовом способе внеклеточную часть человеческого CD38 можно наносить на поверхность планшета для ELISA. В течение около 15 минут можно добавлять избыток немеченого даратумумаба, а впоследствии можно добавлять биотинилированные исследуемые антитела. После промывок в ФСБ/Твин связывание исследуемых биотинилированных антител можно выявлять с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина с детекцией сигнала с помощью стандартных способов. Очевидно, что в конкурентных анализах даратумумаб может быть меченым, а исследуемое антитело - немеченым. Исследуемое антитело конкурирует с даратумумабом, если даратумумаб ингибирует связывание исследуемого антитела или исследуемое антитело ингибирует связывание даратумумаба на 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. Можно дополнительно определить эпитоп исследуемого антитела, например, путем пептидного картирования или анализа водородно-дейтериевого обмена, используя известные способы.

Другой вариант реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38

антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

Другой вариант реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). Антитело «связывается с областью SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3)», если антитело связывается, по меньшей мере, с одним аминокислотным остатком в пределах каждой области. Антитело может связывать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислотных остатков в пределах каждой области SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO: 3. Также антитело может необязательно связывать один или более остатков за пределами областей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Связывание можно оценить известными способами, такими как исследование мутагенеза или расшифровка кристаллической структуры CD38 в комплексе с антителом. В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, эпитоп антитела содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту в области SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и, по меньшей мере, одну аминокислоту в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, эпитоп антитела содержит по меньшей мере две аминокислоты в области SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и, по меньшей мере, две

аминокислоты в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, эпитоп антитела содержит, по меньшей мере, три аминокислоты в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и, по меньшей мере, три аминокислоты в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, анти-CD38 антитело связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, KRN в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 22) в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, KRN в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 22) в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

Типовым антителом, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1) или как минимум с остатками KRN и VQLT (SEQ ID NO: 22), как показано выше, является даратумумаб, имеющий некоторые последовательности VH, VL и CDR, как описано выше. Антитела, которые связываются с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов, а также как описано в данном документе. Антитела можно дополнительно оценить, например, с помощью анализа конкуренции между даратумумабом и исследуемым антителом за связывание с CD38, как описано выше.

В описанных в данном документе способах и в некоторых

вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело может связывать CD38 человека в некотором диапазоне значений аффинности (K_D). В одном варианте реализации в соответствии с изобретением и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело связывается с CD38 с высокой аффинностью, например, со значением K_D , равным или составляющим менее чем около 10^{-7} М, таким как около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М, около 1×10^{-10} М, около 1×10^{-11} М, около 1×10^{-12} М, около 1×10^{-13} М, около 1×10^{-14} М, около 1×10^{-15} М или соответствующим любому входящему в данный интервал диапазону или значению, определяемым методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Kinexa, как практикуется специалистами в данной области техники. Одно типовое значение аффинности равно 1×10^{-8} М или менее. Другое типовое значение аффинности равно 1×10^{-9} М или менее.

В некоторых описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело обладает 2-антенарной гликановой структурой с содержанием фукозы в диапазоне от около 0% до около 15%, например, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%.

В некоторых описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело обладает 2-антенарной гликановой структурой с содержанием фукозы около 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%

Замены в Fc и сниженное содержание фукозы может усиливать АЗКЦ-активность анти-CD38 антитела.

«Содержание фукозы» относится к количеству моносахарида фукозы в сахарной цепи в Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур относительно всех гликоструктур. Гликоструктуры могут быть охарактеризованы и количественно оценены множеством

способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественной оценкой с помощью ВЭЖХ (СВЭЖХ) с выявлением флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализа интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой гликанов Asn297 или без нее с помощью Endo S или другого фермента, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, оставляя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщепления mAb на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующего разделения, выявления и количественной оценки с помощью ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); или 5) отделения олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования PNGase F в Asn 297. Высвобожденные олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сialiлирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Определение «низкофукозный» или «с низким содержанием фукозы», применяемое в настоящей заявке, относится к антителам с содержанием фукозы около 0-15%.

Определение «нормальнофукозный» или «с нормальным содержанием фукозы», применяемое в данном документе, относится к антителам с

содержанием фукозы более, чем около 50%, как правило, более, чем около 60%, 70%, 80% или более 85%.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном

документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 14 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 15.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 16 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 17.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 18 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 19.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 20 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 21.

В некоторых способах изобретения, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 13.

Антитела, которые в значительной степени идентичны антителу, содержащему тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13, могут применяться в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без

исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации. Употребляемый в данном документе термин «в значительной степени идентичный» означает, что аминокислотные последовательности двух сравниваемых тяжелых цепей или легких цепей антител идентичны или имеют «несущественные отличия». Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, не оказывающие отрицательного влияния на свойства антитела. Процентное значение идентичности можно определять, например, путем попарного выравнивания с применением настроек по умолчанию в модуле AlignX программы Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности согласно настоящему изобретению можно применять в качестве поисковой последовательности при осуществлении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для осуществления такого поиска, являются XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Уэстборо, штат Массачусетс, США) с настройками по умолчанию. Типовые замены, которые можно проводить в анти-CD38 антителах, применяемых в способах согласно изобретению, представляют собой, например, консервативные замены аминокислотами, имеющими аналогичный заряд, гидрофобные свойства или стереохимические характеристики. Консервативные замены также можно проводить для улучшения свойств антитела, например стабильности или аффинности, или для улучшения эффекторных функций антитела. Можно делать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, например, в тяжелой или легкой цепи анти-CD38 антитела. Более того, любой нативный остаток в тяжелой или легкой цепи также можно заменять на аланин, как ранее было описано для аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan *et al.*, *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998; Sasaki *et al.*, *Adv Biophys* 35:1-24, 1998). Специалисты в данной области могут определить необходимые аминокислотные

замены, в случае, когда такие замены необходимы. Аминокислотные замены можно проводить, например, с помощью ПЦР-мутагеназа (патент США № 4683195). Библиотеки вариантов можно создавать с помощью хорошо известных способов, например путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например, кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), и скрининга библиотек в отношении вариантов с необходимыми свойствами. Созданные варианты можно исследовать в отношении связывания с CD38, способности индуцировать АЗКЦ, АЗКФ или апоптоз *in vitro* с применением способов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих анти-CD38 антител или области VL и VH, идентифицированные *de novo*, как описано выше, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ между двумя тяжелыми цепями моноспецифических антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как описанные в патенте США № 7695936; международной патентной публикации № WO04/111233; патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2007/0287170; международной патентной публикации № WO2008/119353; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/0286374; патентной публикации США № US2011/0123532; международной патентной публикации № WO2011/131746; международной патентной публикации № WO2011/143545; или патентной публикации США № US2012/0149876. Дополнительные биспецифические структуры, в которые могут быть встроены области VL и/или VH антител согласно изобретению, могут представлять собой, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация № WO2009/134776) или структуры, которые включают различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например димеризационные домены

«лейциновых молний» или коллагена (международная патентная публикация № WO2012/022811, патентная публикация США № 5932448; патент США № 6833441).

Другой вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

Другой вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует гибель *in vitro* клеток, экспрессирующих CD38, посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

Другой вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ).

Другой вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение

нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ).

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению анти-CD38 антителом.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению анти-CD38 антителом.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или

комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего множественную миелому, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего множественную миелому, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом.

В некоторых вариантах реализации описанного в данном документе изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом, при этом, по меньшей мере, один, химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид, бортезомиб, мелфалан, дексаметазон или талидомид.

В некоторых вариантах реализации описанного в данном документе изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом, при этом, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид, бортезомиб, мелфалан, дексаметазон или талидомид, циклофосфамид, гидроксидоанурубидин (доксорубидин), винкристин или преднизон.

В некоторых вариантах реализации описанного в данном

документе изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом, при этом, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид и/или бортезомиб.

Для того, чтобы определить, является ли субъект устойчивым, развилась ли у него устойчивость или он расположен к развитию устойчивости к лечению анти-CD38 антителом или другим терапевтическим агентом, можно применять различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с устойчивостью, включают, например, ухудшение или отсутствие улучшения самочувствия пациента, увеличение размера опухоли, увеличение количества раковых клеток, прекращение или замедление торможения роста опухоли или опухолевых клеток и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Повторное установление ухудшения различных симптомов, связанных с опухолью, также может свидетельствовать о том, что у субъекта развилась или он расположен к развитию устойчивости к анти-CD38 антителу или другому терапевтическому агенту. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьироваться в зависимости от типа ракового заболевания. Например, симптомы, связанные с В-клеточными злокачественными опухолями могут включать увеличение лимфатических узлов в шее, пахе или подмышках, жар, ночную потливость, кашель, боль в груди, необъяснимую потерю массы, вздутие живота или боль в животе или чувство переполнения. Ремиссию при злокачественных лимфомах стандартизируют в соответствии с критерием Чесона (*Cheson et al., J Clin Oncology 25:579-586, 2007*), а данное руководство можно использовать, чтобы определить, развилась ли у субъекта устойчивость в анти-CD38 антителу или другому терапевтическому агенту.

В некоторых вариантах реализации описанного в данном документе изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации субъект, имеющий CD38-положительную гематологическую

злокачественную опухоль, является гомозиготным в отношении фенилаланина в позиции 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/F) или гетерозиготным в отношении валина и фенилаланина в позиции 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/V). CD16 также известен как Fc-гамма рецептор IIIa (FcγRIIIa) или изоформа III-A низкоаффинного рецептора Fc-области иммуноглобулина гамма. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в позиции остатка 158 белка FcγRIIIa отрицательно влияет на аффинность FcγRIIIa к человеческому IgG. Рецептор с полиморфизмами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V демонстрирует сниженное взаимодействие с Fc и, таким образом, сниженную по сравнению с FcγRIIIa-158V/V АЗКЦ. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах повышает способность антител индуцировать АЗКЦ вследствие улучшенного связывания антител с человеческим FcγRIIIa (CD16) (Shields *et al.*, J Biol Chem 277:26733-40, 2002). С помощью стандартных способов пациентов можно проанализировать на наличие у них полиморфизма FcγRIIIa.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом субъект является гомозиготным в отношении фенилаланина в позиции 158 CD16 или гетерозиготным в отношении валина и фенилаланина в позиции 158 CD16.

Также в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), а субъект является гомозиготным в отношении фенилаланина в позиции 158 CD16 или гетерозиготным в отношении валина и фенилаланина в позиции 158 CD16.

Введение/фармацевтические композиции

В способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитела могут быть предложены в подходящих фармацевтических композициях, содержащих анти-CD38 антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, вспомогательное вещество или несущую среду, с которыми вводят анти-CD38 антитело. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и практически не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т.д. Концентрация молекул или антител согласно изобретению в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5% обычно по меньшей мере до около 1% и до 15 или 20% масс., и подбирается преимущественно на основании необходимой дозы, объема жидкости, значения вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые носители и составы, включая другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см. в особенности pp. 958-989.

Способом введения анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению может быть любой приемлемый путь, такой как

парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, ингаляционное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), или другие средства, известные специалисту, как хорошо известно в данной области техники.

Анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить пациенту любым приемлемым путем, например, парентерально посредством внутривенной (в.в.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно или подкожно, или внутрибрюшинно. в.в. инфузию можно осуществлять в течение более, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут, или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов.

Доза, вводимая пациенту, имеющему CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, является достаточной, чтобы облегчить или по меньшей мере частично затормозить заболевание, лечение которого осуществляется («терапевтически эффективное количество»), и может иногда составлять от 0,005 мг/кг до около 100 мг/кг, например, от около 0,05 мг/кг до около 30 мг/кг, или от около 5 мг до около 25 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно давать фиксированную единичную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или же доза может зависеть от площади поверхности тела пациента и составлять, например 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения CD38-положительной В-клеточной злокачественной опухоли обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо

суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде постоянного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению можно вводить в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода 6 месяцев или более.

Например, анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или, в альтернативном варианте, по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или в любой их комбинации.

Анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, отложить начало появления признаков прогрессирования рака и/или снизить риск

повторного появления в случае ремиссии рака. В особенности это целесообразно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

Анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации также можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать перед применением в приемлемом носителе. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов, и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

ПТРК может предоставляться в дозировке 45 мг/м²/день ПО или 25 мг/м²/день ПО.

Анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК) и третьим терапевтическим агентом.

В способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации третий терапевтический агент может представлять собой мелфалан, мехлорэтамин, тиотепу, хлорамбуцил, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин, талидомид или аналог талидомида, леналидомид или CC4047, ингибитор протеасом, такой как бортезомиб, или алкалоид барвинка, такой как винкристин, или антрациклин, такой как доксорубицин.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты реализации изобретения будут дополнительно раскрыты в следующих

примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

Дополнительные варианты реализации изобретения

Ниже изложены некоторые дополнительные варианты реализации изобретения в соответствии с описаниями, представленными в других частях настоящего документа. Признаки из вариантов реализации изобретения, относящиеся к раскрытому в данном документе изобретению, также относятся к каждому без исключения из этих дополнительных пронумерованных вариантов реализации.

1. Анти-CD38 антитело для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

2. ПТРК для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с анти-CD38 антителом.

3. Комбинация анти-CD38 антитела и ПТРК для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль.

4. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3, причем анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством

a. антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ);

b. комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ); или

c. Как АЗКЦ, так и КЗЦ *in vitro*.

5. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3, причем анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ *in vitro*.

6. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4 или 5, ПТРК для применения в

соответствии с вариантом реализации 2, 4 или 5 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-5, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

7. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-6, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-6 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-6, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ММ.

8. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-7, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-7 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-7, причем субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом и анти-CD38 антителом или комбинацией из, по меньшей мере, одного химиотерапевтического агента и анти-CD38 антитела.

9. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-8, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-8 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-8, причем, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид, бортезомиб, малфалан, дексаметазон или талидомид.

10. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-9, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-9 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-9, причем, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид или бортезомиб.

11. Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-10, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-10 или комбинация для применения в

соответствии с вариантом реализации 3-10, причем

а. анти-CD38 антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4;

б. анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;

в. анти-CD38 антитело связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1);

г. анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;

д. анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;

е. анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;

ж. анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 13;

з. анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13

и. анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;.

й. анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;

к. анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или

л. анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

м.

Пример 1. Общие способы

Антитела и реагенты

В качестве изотипического контроля использовали человеческое mAb против безвредного антигена (ВИЧ-1 gp120), как было описано ранее (van der Veers *et al.*, Haematologica 96:284-290, 2011; van der Veers *et al.*, Blood Cancer J 1:e41, 2011). Полностью *транс*-ретиноевую кислоту (ПТРК) приобрели у Sigma-Aldrich и развели в ДМСО.

Анализ АЗКЦ на основании биолюминесцентной визуализации (БЛВ) с применением трансдуцированных люциферазой (LUC) клеточных линий ММ

LUC-трансдуцированные клеточные линии ММ совместно культивировали с эффекторными клетками (свежевыделенными из организма здоровых доноров МКПК) при соотношении эффектор:мишень 1:25 в белых непрозрачных 96-луночных планшетах с плоским дном (Costar) в присутствии даратумумаба (0,001, 0,01, 0,1 и 1,0 мкг/мл) в течение четырех часов. Затем методом БЛВ определяли выживаемость клеток LUC⁺-ММ через 10 минут после добавления субстрата люциферина (125 мкг/мл; Promega). Лизис клеток ММ определяли с помощью следующей формулы: % лизиса = 1 - (средний сигнал БЛВ в присутствии эффекторных клеток и даратумумаба / средний сигнал БЛВ в присутствии эффекторных клеток и контрольного антитела) x 100%.

Основанный на БЛВ анализ КЗЦ с применением LUC-трансдуцированных клеточных линий ММ

Даратумумаб (0, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 и 3,0 мкг/мл) добавляли к клеточным линиям ММ в среде, дополненной смешанной человеческой сывороткой (10%; Sanquin) или инактивированной нагреванием человеческой сывороткой. После 1 часа инкубации при 37°C методом БЛВ определяли клеточный лизис через 10 минут после добавления люциферина (125 мкг/мл) и рассчитывали с помощью следующей формулы: % лизиса = 1 - (средний сигнал БЛВ в присутствии нативной человеческой сыворотки / средний сигнал БЛВ в присутствии инактивированной нагреванием человеческой сыворотки) x 100%.

***Ex vivo* анализ АЗКЦ и КЗЦ на основании проточной цитометрии в МНК-КМ**

Свежевыделенные МНК-КМ, содержащие 2-57% злокачественных плазмоцитов согласно определению методом проточной цитометрии, незамедлительно использовали в *ex vivo* экспериментах. Для экспериментов по АЗКЦ МНК-КМ, содержащие злокачественные плазмоциты, а также собственные эффекторные клетки пациента, инкубировали в RPMI+10% фетальной бычьей сыворотке с даратумумабом (0,01-10 мкг/мл) в 96-луночных планшетах с плоским дном в полностью влажных инкубаторах при 37°C, смесь 5% CO₂-воздух, в течение 48 часов. Жизнеспособность образцов составляла более 98% согласно оценке с помощью ToPro-3 (Invitrogen/Molecular Probes). Для анализа КЗЦ МНК-КМ обрабатывали даратумумабом (0,3-10 мкг/мл) и комплементом в течение 1 часа перед проведением анализа методом проточной цитометрии. В качестве источника комплемента использовали смешанную человеческую сыворотку (10%). Выживаемость первичных клеток CD138⁺ ММ в МНК-КМ определяли методом проточной цитометрии, ранее описанным в (van der Veers et al., Haematologica 96:284-290, 2011; van der Veers et al., Blood Cancer J 1:e41, 2011). Выживаемость клеток ММ рассчитывали с помощью единой платформы для анализа методом проточной цитометрии клеток CD138⁺ (с CD138-PE (Beckman Coulter, Майами, штат Флорида, США)) в присутствии флуоросфер Flow-Count (Beckman Coulter), чтобы определить абсолютное число клеток. Процентную долю лизиса клеток ММ в разных условиях обработки определяли по сравнению с выживаемостью ММ в лунках, обработанных контрольным антителом (IgG1-b12 в качестве контрольного антитела IgG1 для даратумумаба) с помощью следующей формулы: % лизиса клеток = $1 - (\text{абсолютное число выживших клеток CD138}^+ \text{ в обработанных лунках} / \text{абсолютное число выживших клеток CD138}^+ \text{ в контрольных лунках}) \times 100\%$.

Имунофенотипирование методом проточной цитометрии

Методом анализа проточной цитометрии определяли экспрессию нескольких белков клеточной поверхности, применяя FITC-, PE-,

Per-CP- или APC-конъюгированные моноклональные антитела. Анти-CD38, анти-CD138 и анти-CD56 приобрели у Beckman Coulter; анти-CD3, анти-CD16, анти-CD55, анти-CD59 у BD Biosciences; и анти-CD46 у Biolegend. Проточную цитометрию осуществляли с помощью устройства FACS-Calibur (Becton Dickinson); данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest.

Статистика

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Prism (Graphpad Software Inc, версия 5). Сравнение между переменными проводили с использованием двухстороннего *t*-критерия Стьюдента. Корреляцию между переменными осуществляли с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Существенными считали *p*-значения ниже 0,05.

Пример 2. ПТРК повышает экспрессию CD38 в клеточных линиях ММ и в первичных клетках ММ

Повышение уровней экспрессии CD38 может повысить эффективность даратумумаба в отношении уничтожения клеток ММ посредством АЗКЦ или КЗЦ. Взаимодействие ПТРК с ядерными рецепторами ретиноевой кислоты приводит к изменению экспрессии генов-мишеней, включая индукцию экспрессии CD38 (Malavasi F. J Leukoc Biol 90:217-219, 2011; Drach *et al.*, Cancer Res 54:1746-1752, 1994). Следовательно, исследовали влияние ПТРК на клеточные линии ММ RPMI8226, UM9 и XG1. Клетки ММ инкубировали со средой RPMI-1640, одной или с ПТРК в диапазоне 0-25 нМ в течение 48 часов (Фигура 1А), или инкубировали с 10 нМ ПТРК в течение 24, 48, 72 или 96 часов (Фигура 1В), а затем собирали, чтобы определить экспрессию CD38 методом проточной цитометрии с помощью устройства FACS-Calibur (Becton Dickinson) и анти-CD38 антитела (Beckman Coulter). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest.

Для того чтобы индуцировать 1,9- 4,4-кратное повышение экспрессии CD38 в клеточных линиях ММ RPMI8226, UM9 и XG1, достаточно было минимум 10 нМ ПТРК. Более высокие дозы ПТРК не приводили к дополнительному повышению экспрессии CD38 (Фигура 1А). Максимальное повышение экспрессии CD38 происходило через 48 часов (Фигура 1В). Следовательно, во всех последующих

экспериментах использовали 10 нМ ПТРК в течение 48 часов.

Также исследовали *ex vivo* обработку ПТРК (10 нМ, 48 часов) первичных клеток ММ от 26 пациентов. В этих экспериментах МНК-КМ от 26 пациентов с инкубировали со средой RPMI-1640, одной или с 10 нМ ПТРК в течение 48 часов, инкубировали при 4°C в течение 20 минут с FITC-конъюгированным антителом к CD38 (Beckman Coulter), а затем собирали, чтобы определить экспрессию CD38 методом проточной цитометрии. Анализ методом проточной цитометрии осуществляли с помощью устройства FACS-Calibur (Becton Dickinson); данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest.

ПТРК индуцировал экспрессию CD38 (среднее повышение - 1,7 раз, диапазон - 1,0-26,5 раз) (Фигура 2). Также наблюдалось существенное повышение уровней экспрессии CD138 (среднее повышение: 2,0 раз), что характерно для дифференцировки клеток ММ. В противоположность этому в экспрессии других плазмочитарных антигенов, таких как HLA A/B/C или CD56, не наблюдалось существенных изменений в ответ на ПТРК.

Пример 3. ПТРК-опосредованное повышение регуляции CD38 усиливает даратамуаб-опосредованную АЗКЦ и КЗЦ против клеток ММ

Возможное влияние ПТРК-индуцированного повышения регуляции экспрессии CD38 на даратамуаб индуцированную АЗКЦ и КЗЦ исследовали в клеточных линиях ММ XG-1, RPMI8226 и UM9 и в первичных клетках ММ.

Для клеточных линий ММ КЗЦ и АЗКЦ оценивали с помощью биолюминесцентной визуализации (БЛВ) на основании описанных выше методов анализа АЗКЦ и КЗЦ. Для первичных клеток ММ КЗЦ и АЗКЦ оценивали с помощью *ex vivo* анализа АЗКЦ и КЗЦ на основании проточной цитометрии в МНК-КМ, как описано выше. В этих методах анализа клетки предварительно обрабатывали 10 нМ ПТРК или контрольным раствором в течение 48 часов с последующей инкубацией с или без даратумумаба в присутствии МКПК в качестве эффекторных клеток для оценки АЗКЦ или в присутствии человеческой сыворотки в качестве источника комплемента в случае анализа КЗЦ. Изотипический контроль добавляли в концентрации 10

мкг/мл, а в качестве контроля для КЗЦ использовали 10% инактивированную нагреванием сыворотку.

На Фигуре 3А, Фигуре 3В и Фигуре 3С проиллюстрированы результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ и АЗКЦ в клеточных линиях ХG1, RPMI8226 и UM9 соответственно.

10 нМ одной ПТРК не приводили к индукции лизиса клеток ММ. Предварительная обработка клеточных линий ММ 10 нМ ПТРК существенно усиливала даратумумаб-опосредованную КЗЦ в клетках ХG-1 (Фигура 3А) и АЗКЦ в клетках ХG-1 (Фигура 3А) и UM9 (Фигура 3С) по сравнению с контрольным раствором (Фигура 3А). В клетках RPMI8226 не наблюдали существенного улучшения даратумумаб-индуцированной АЗКЦ и КЗЦ. Эту разницу в реакции на ПТРК частично можно объяснить тем фактом, что ПТРК усиливала экспрессию CD38 в 2,9 раза в ХG-1 и 4,4 раза в UM9, в то время как повышение регуляции в клетках RPMI8226 было только 1,9-кратным (Фигура 1А и 1В).

Пример 4. ПТРК-опосредованное повышение регуляции CD38 усиливает даратумумаб-опосредованную АЗКЦ и КЗЦ против первичных клеток ММ.

Оценивали первичные клетки ММ, чтобы дополнительно исследовать влияние ПТРК-опосредованной индукции экспрессии CD38 на чувствительность к даратумумабу.

На Фигуре 4А и Фигуре 4В проиллюстрированы результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ и АЗКЦ соответственно в первичных клетках ММ, предварительно обработанных в течение 48 часов с или бел 10 нМ ПТРК. Графики на Фигуре 4А и Фигуре 4В представляют объединенные результаты по 16 или 13 полученным от пациентов образцам соответственно.

В первичных клетках ММ предварительная обработка ПТРК в течение 48 часов приводила к существенному повышению из восприимчивости к даратумумаб-опосредованной КЗЦ у 13 из 16 пациентов (данные не показаны) и АЗКЦ у 8 из 11 пациентов (данные не показаны). Объединенные результаты по этим пациентам показывают, что ПТРК улучшает КЗЦ, опосредованную 10 мкг/мл даратумумаба в среднем от 16,1% до 43,9% ($P < 0,0001$) (Фигура 4А), а АЗКЦ, опосредованная 10 мкг/мл даратумумаба была улучшена

ПТРК в среднем от 25,1% до 39,5% ($P=0,0315$) (Фигура 4В).

Фигура 5 иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от каждого пациента. Фигура 5А иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 1 и пациента 2. Фигура 5В иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 3 и пациента 4. Фигура 5С иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 5 и пациента 6. Фигура 5D иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 7 и пациента 8. Фигура 5Е иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 9 и пациента 10. Фигура 5F иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 11 и пациента 12. Фигура 5G иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 13 и пациента 14. Фигура 5h иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 15 и пациента 16. ПТРК индуцирует даратумумаб-опосредованную КЗЦ в первичных клетках ММ, которые не были восприимчивы к одному даратумумабу *in vitro* (например, пациенты 1, 4, 8, 12, 13, 15 и 16). Эти первичные клетки ММ были выделены из организма пациентов с рефрактерным или вдвойне рефрактерным заболеванием, как указано в Таблице 1. В образцах первичных клеток ММ некоторых пациентов ПТРК не оказывала дополнительное влияние, состоящее в усилении даратумумаб-опосредованной КЗЦ (например, см. данные по пациентам 6, 7 и 14).

Фигура 6 иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной АЗКЦ в первичных клетках ММ от каждого пациента. Фигура 6А иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 3 и пациента 4. Фигура 6В иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 7 и пациента 8. Фигура 6С иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 9 и пациента 10. Фигура 6D

иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 14 и пациента 15. Фигура 6Е иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 16 и пациента 17. Фигура 6f иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 18. ПТРК индуцировала даратумумаб-опосредованную АЗКЦ в большинстве исследуемых первичных клеток ММ. Эти первичные клетки ММ были выделены из организма пациентов с рефрактерным или вдвойне рефрактерным заболеванием, как указано в Таблице 1.

Также исследовали поверхностную экспрессию CD38 во всех исследуемых первичных клетках ММ в МНК-КМ, инкубируемых со средой RPMI-1640, одной или с 10 нМ ПТРК в течение 48 часов (Фигура 7).

Общие результаты позволяют предположить, что ПТРК является перспективной стратегией для улучшения экспрессии CD38 и активности даратумумаба в клеточных линиях ММ и в первичных клетках ММ, включая клетки ММ, которые являются рефрактерными в отношении даратумумаб-опосредованной КЗЦ и/или АЗКЦ.

В Таблице 1 приведены исходные характеристики МНК-КМ исследуемых 19 пациентов с ММ. В таблице: * леналидомид- и/или бортезомиб-рефрактерное заболевание определяется как прогрессирующее заболевание при наличии терапии леналидомидом и бортезомибом, отсутствие ответа (менее, чем частичный ответ) на терапию леналидомидом и бортезомибом или прогрессирующее заболевание в течение 60 дней после прекращения схемы лечения, включающей леналидомид и бортезомиб, в соответствии с Международными едиными критериями ответа при множественной миеломе.

Таблица 1.

Параметр:	Пациент					
	1	2	3	4	5	6
Возраст (лет)	71	43	71	64	64	55
Пол	М,	М,	Ф	М,	М,	Ф
Тип моноклональной тяжелой цепи	IgG	-	-	IgD	-	IgG

Тип легкой цепи	К	К	Л	К	Л	Л
Предыдущая терапия						
Предыдущие линии терапии (число)	10	4	4	6	3	0
Предыдущая трансплантация стволовых клеток	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Аутологичных	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Аллогенных	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Предыдущее лечение леналидомидом	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
рефрактерный статус к леналидомиду*	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Предыдущее лечение бортезомибом	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
рефрактерный статус к бортезомибу*	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Экспрессия CD38 на клетках ММ (СИФ)	1258	1346	764	1275	2642	1134
Экспрессия CD46 на клетках ММ (СИФ)	1165	264	866	1346	661	1124
Экспрессия CD55 на клетках ММ (СИФ)	610	119	552	227	1	594
Экспрессия CD59 на клетках ММ (СИФ)	235	62	228	108	7	90

Пациент						
Параметр:	7	8	9	10	11	12
Возраст (лет)	55	64	75	63	56	59
Пол	F	M,	M,	F	M,	M,
Тип моноклональной тяжелой цепи	IgA	-	-	IgA	IgA	-
Тип легкой цепи	L	K	L	K	K	K

Предыдущая терапия						
Предыдущие линии терапии (число)	2	2	5	6	2	4
Предыдущая трансплантация стволовых клеток	Да	Да	Нет	Да	Да	Да
Аутологичных	Да	Да	Нет	Да	Да	Да
Аллогенных	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Предыдущее лечение леналидомидом	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
рефрактерный статус к леналидомиду*	Нет	Да	Да	Да	Нет	Да
Предыдущее лечение бортезомибом	Да	Да	Да	Да	Нет	Да
рефрактерный статус к бортезомибу*	Да	Нет	Да	Да	Нет	Нет
Экспрессия CD38 на клетках ММ (СИФ)	1999	578	1252	1310	843	64

Экспрессия CD46 на клетках ММ (СИФ)	2288	4870	1700	196	368	264
Экспрессия CD55 на клетках ММ (СИФ)	655	528	813	4	362	60
Экспрессия CD59 на клетках ММ (СИФ)	92	151	241	7	74	47

Пациент						
Параметр:	13	14	15	16	17	18
Возраст (лет)	71	72	67	64	63	53
Пол	F	M,	M,	M,	M,	M,
Тип моноклональной тяжелой цепи	-	-	IgG	-	IgG	IgA
Тип легкой цепи	L	K	K	K	L	K
Предыдущая терапия						
Предыдущие линии терапии (число)	4	5	2	3	4	2
Предыдущая трансплантация стволовых клеток	Да	Нет	Нет	Да	Да	Да
Аутологичных	Да	Нет	Нет	Да	Да	Да
Аллогенных	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Предыдущее лечение леналидомидом	Да	Да	Да	Да	Нет	Да
рефрактерный статус к леналидомиду*	Да	Да	Да	Да	Нет	Да
Предыдущее лечение бортезомибом	Да	Да	Да	Да	Да	Да
рефрактерный статус к бортезомибу*	Да	Да	Нет	Да	Нет	Да
Экспрессия CD38 на клетках ММ (СИФ)	173	241	78	1000	667	11
Экспрессия CD46 на клетках ММ (СИФ)	300	492	362	491	538	557
Экспрессия CD55 на клетках ММ (СИФ)	379	1275	59	176	231	519
Экспрессия CD59 на клетках ММ (СИФ)	188	75	9	107	70	52

МНК-КМ; мононуклеарные клетки костного мозга. ММ; множественная миелома. М; мужчина. Ж; женщина. К; каппа. L; лямбда

Пример 5. ПТРК снижает экспрессию CD55 и CD59 в первичных клетках ММ

Проведенные эксперименты показали, что предварительная обработка клеток ММ ПТРК делает эти клетки более восприимчивыми к даратумумаб-опосредованной АЗКЦ и КЗЦ. Улучшение в КЗЦ было более ярко выраженным, чем усиление АЗКЦ. Оценивали молекулярное

основание наблюдаемых фактов.

Оценивали влияние ПТРК на эффекторные клетки. ПТРК не оказывала влияние или оказывала минимальное влияние на способность МКПК от здоровых доноров индуцировать АЗКЦ в человеческих клеточных линиях MM L363-CD38, LME-1, RPMI8226 и UM9 (данные не показаны). В противоположность этому ПТРК снижала уровни экспрессии комплемент-ингибиторных белков CD55, CD59 и CD46 в клеточных линиях MM и первичных клетках MM. В клетках RPMI8226 (Фигура 8А), L363 (Фигура 8В) и XG-1 (Фигура 8С) ПТРК снижала уровни экспрессии CD55, CD59 и CD46. В первичных клетках MM, полученных от 16 пациентов, ПТРК существенно снижала экспрессию CD55 (среднее снижение 21,3%, $P=0,019$) (Фигура 9А) и CD59 (среднее снижение 37,5%, $P=0,0047$) (Фигура 9В), при этом ПТРК существенно не влияла на уровни экспрессии CD46 (данные не показаны). Уровни экспрессии CD46, CD55 и CD59 в исследуемых образцах от 16 пациентов приведены на Фигуре 10А (CD55), Фигуре 10В (CD59) и Фигуре 10С (CD46). В этих экспериментах клетки культивировали при 37°C со средой RPMI-1640 с или без 10 нМ ПТРК в течение 48 ч. Затем клетки инкубировали при 4°C в течение 20 минут с подходящей панелью конъюгированных антител. Анализ методом проточной цитометрии осуществляли с помощью устройства FACS-Calibur (Becton Dickinson); данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest.

Пример 6. *In vivo* эффективность комбинации ПТРК и даратумумаба против опухолей MM, растущих в гуманизованном микроокружении.

Гибридные структуры, состоящие из 2-3 мм двухфазных частиц фосфата кальция покрывали *in vitro* человеческими мезенхимальными стромальными клетками (МСК; 2×10^5 клеток/структуру). Через неделю *in vitro* культивирования в остеогенной среде гуманизированные структуры подкожно имплантировали мышам RAG2^{-/-} γ c^{-/-}, как было описано ранее (Groen *et al.*, Blood. 19;120:e9-e16, 2012; de Naart *et al.*, Clin.Cancer Res. 19:5591-5601, 2013).

Через восемь недель после имплантации мыши получали

сублетальную дозу облучения (3 Грэй, 200 кВ, 4 мА), а трансдуцированные люциферазой клетки XG1 инъецировали непосредственно в структуру (1×10^6 клеток/структуру). Через три недели после инокуляции, когда биолюминесцентная визуализация (БЛВ) показывала видимый рост опухолей в структурах, разные группы мышей обрабатывали 1) базовым раствором, 2) ПТРК плюс без-T-клеточными МКПК в качестве эффекторных клеток (МКПК-T), 3) даратумумабом плюс МКПК-T и 4) даратумумабом плюс ПТРК плюс МКПК-T. Даратумумаб (8 мг/кг) вводили внутривенно на 23, 30, и 37 дни; МКПК-T (8×10^6 клеток/мышь) вводили внутривенно на 24, 31 и 38 дни; А ПТРК (10 мг/кг) вводили путем внутривенной инъекции на 21-24, 28-31 и 35-38 дни. МКПК-T готовили путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипак лейкоцитарных пленок и последующего удаления T-клеток посредством CD3-гранул с помощью технологии EasySep™ (STEMCELL Technologies). Рост опухолей отслеживали с помощью еженедельных измерений БЛВ, как было описано ранее (Groen *et al.*, Blood. 19;120:e9-e16, 2012). Все эксперименты над животными проводились после получения разрешения в местном этическом комитете по экспериментам над животными и соответствовали закону Нидерландов об экспериментах над животными. Статическую разницу между разными обрабатываемыми группами в экспериментах с мышами рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни. Значимыми считали *p*-значения ниже 0,05.

Трансдуцированные люциферазой клетки множественной миеломы XG1 развивались в агрессивные опухоли у иммунодефицитных мышей RAG2^{-/-} γ c^{-/-} в гуманизированном микроокружении костного мозга, созданном путем подкожной имплантации керамических структур, покрытых МСК. Чтобы оптимально оценить влияние даратумумаба и ПТРК, мышам совместно инъецировали обогащенные NK-клетками (без-T-клеточные) МКПК здорового донора в комбинации с даратумумабом и/или ПТРК, так как у мышей RAG2^{-/-} γ c^{-/-} нет NK-клеток. Чтобы следить за ростом опухоли еженедельно в течение 5 недель проводили БЛВ. Как показано на Фигуре 11, даратумумаб заметно замедлял прогрессирование опухоли, в то время как одна ПТРК не оказывала никакого влияния. Также в этой модели ПТРК существенно усиливала анти-ММ эффект даратумумаба.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Lokhorst, Henk M.
Mutis, Tuna
Nijhof, Inger S.
Van de Donk, Niels

<120> Варианты комбинированной терапии анти-CD38 антителами

<130> JBI5051WOPCT

<140> Для передачи прав

<141> 2015-09-08

<150> 62/047,877

<151> 2014-09-09

<150> 62/087,287

<151> 2014-12-04

<160> 22

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 300

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
115 120 125

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

130

135

140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
195 200 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
245 250 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
260 265 270

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

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

<210> 2
<211> 14
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 14
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 122
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH анти-CD38 антитела

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL анти-CD38 антитела

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HCDR1 анти-CD38 антитела

<400> 6

Ser Phe Ala Met Ser
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HCDR2 анти-CD38 антитела

<400> 7

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

Gly

<210> 8
<211> 13
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HCDR3 анти-CD38 антитела

<400> 8

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LCDR1 анти-CD38 антитела

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LCDR2 анти-CD38 антитела

<400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LCDR3 анти-CD38 антитела

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 452
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> тяжелая цепь анти-CD38 антитела

<400> 12

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

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

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

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

50

55

60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 214
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> легкая цепь анти-CD38 антитела

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 120
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH анти-CD38 антитела

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL анти-CD38 антитела

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 16

<211> 122

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH анти-CD38 антитела

<400> 16

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL анти-CD38 антитела

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 120
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH анти-CD38 антитела

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 109
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL анти-CD38 антитела

<400> 19

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH анти-CD38 антитела

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL анти-CD38 антитела

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 4
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Gln Leu Thr
1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством КЗЦ *in vitro*.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ *in vitro*.

5. Способ по любому из пп. 1, 2 3 или 4, отличающийся тем, что CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ММ.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом, анти-CD38 антителом или комбинацией из, по меньшей мере, одного химиотерапевтического агента и анти-CD38 антитела.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид, бортезомиб, мелфалан, дексаметазон или талидомид.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид или бортезомиб.

10. Способ по п. 1, 2,3 или 4, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело имеет изотип IgG1.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что антитело связывается с областью SKRNIQFSCNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLQAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 13.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17.

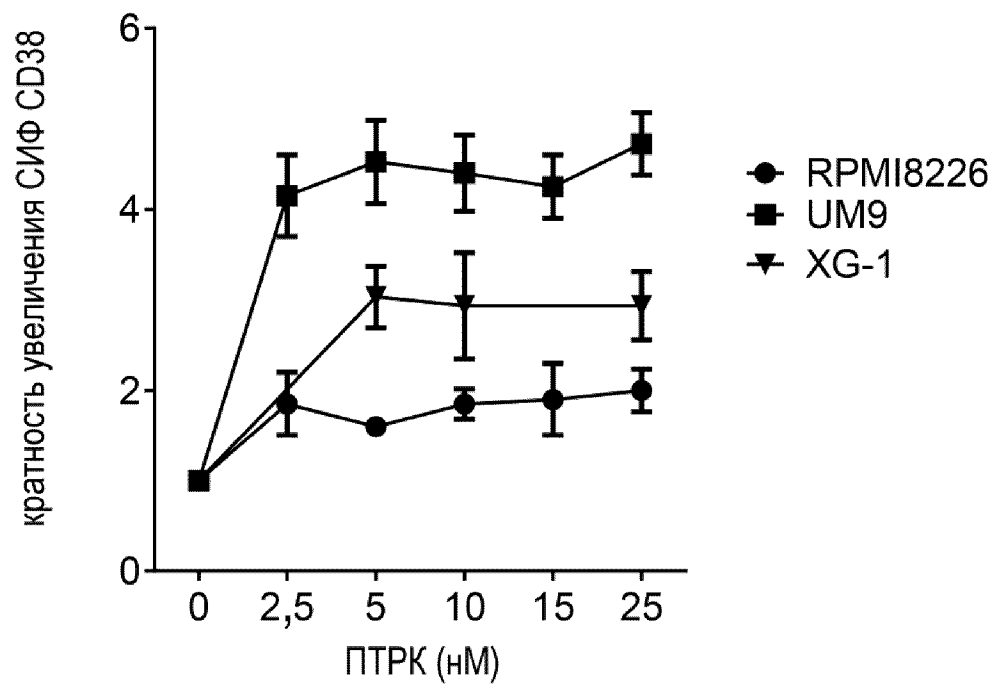
21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело

содержит VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19.

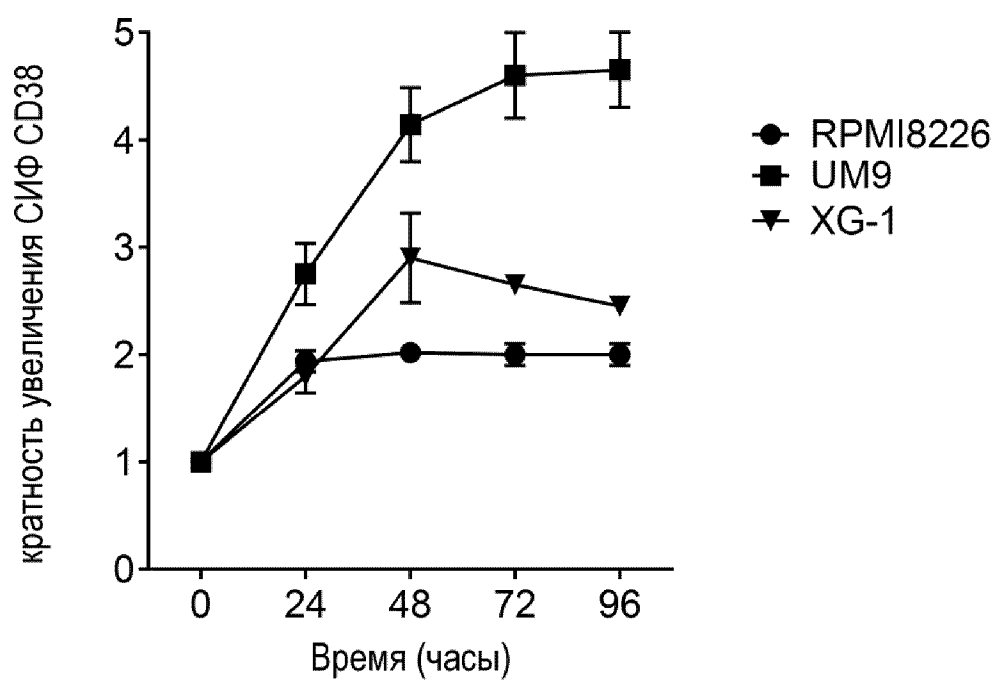
22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

По доверенности

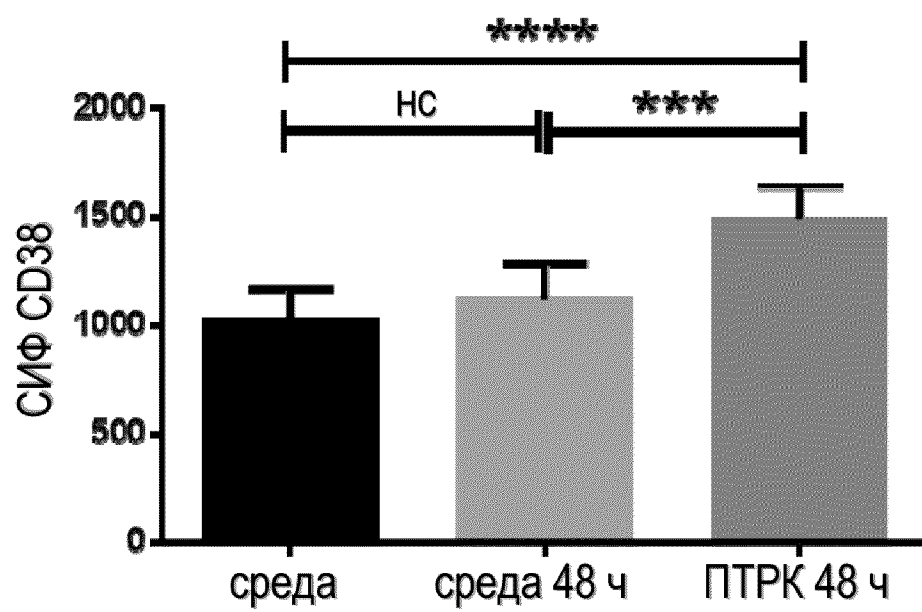
ФИГ. 1А



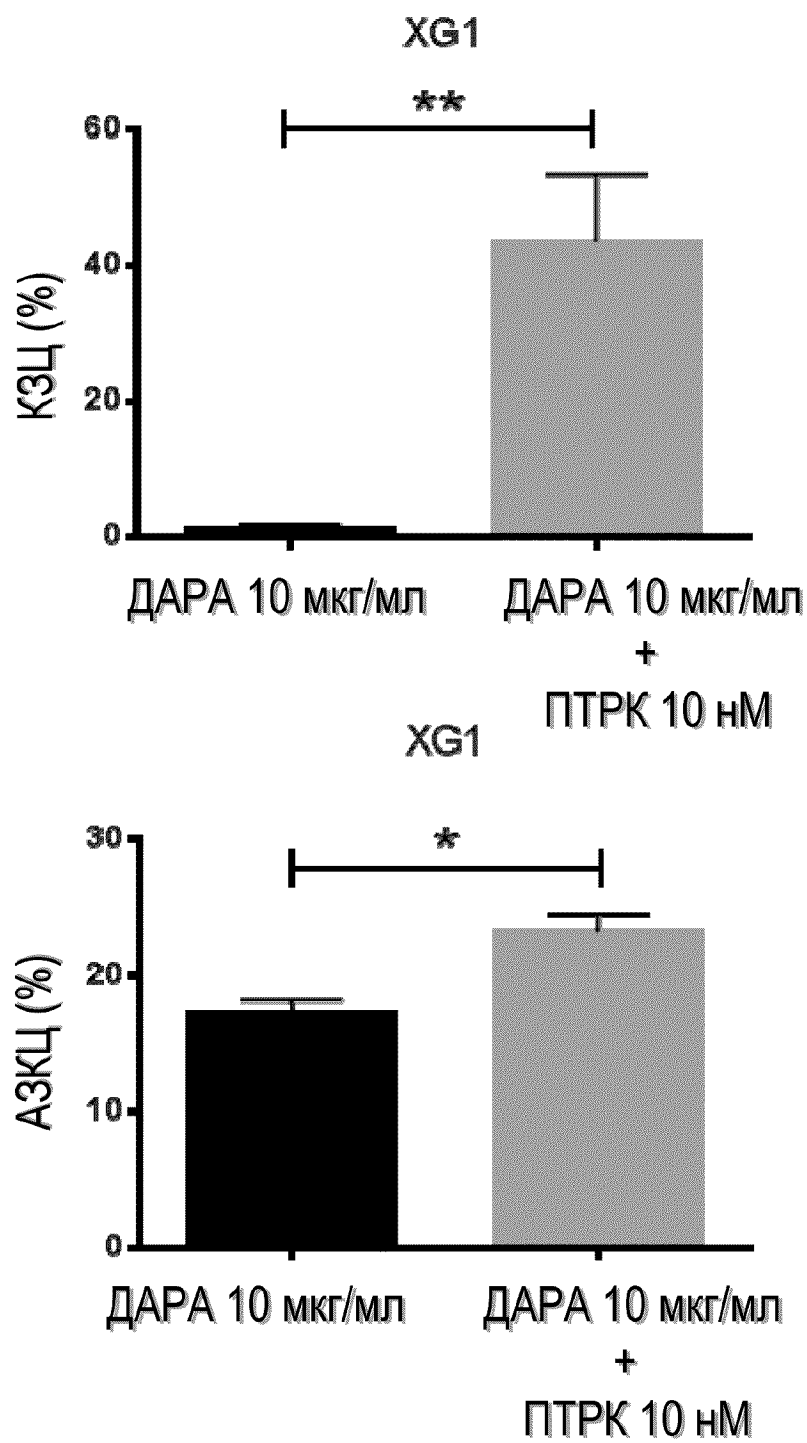
ФИГ. 1В



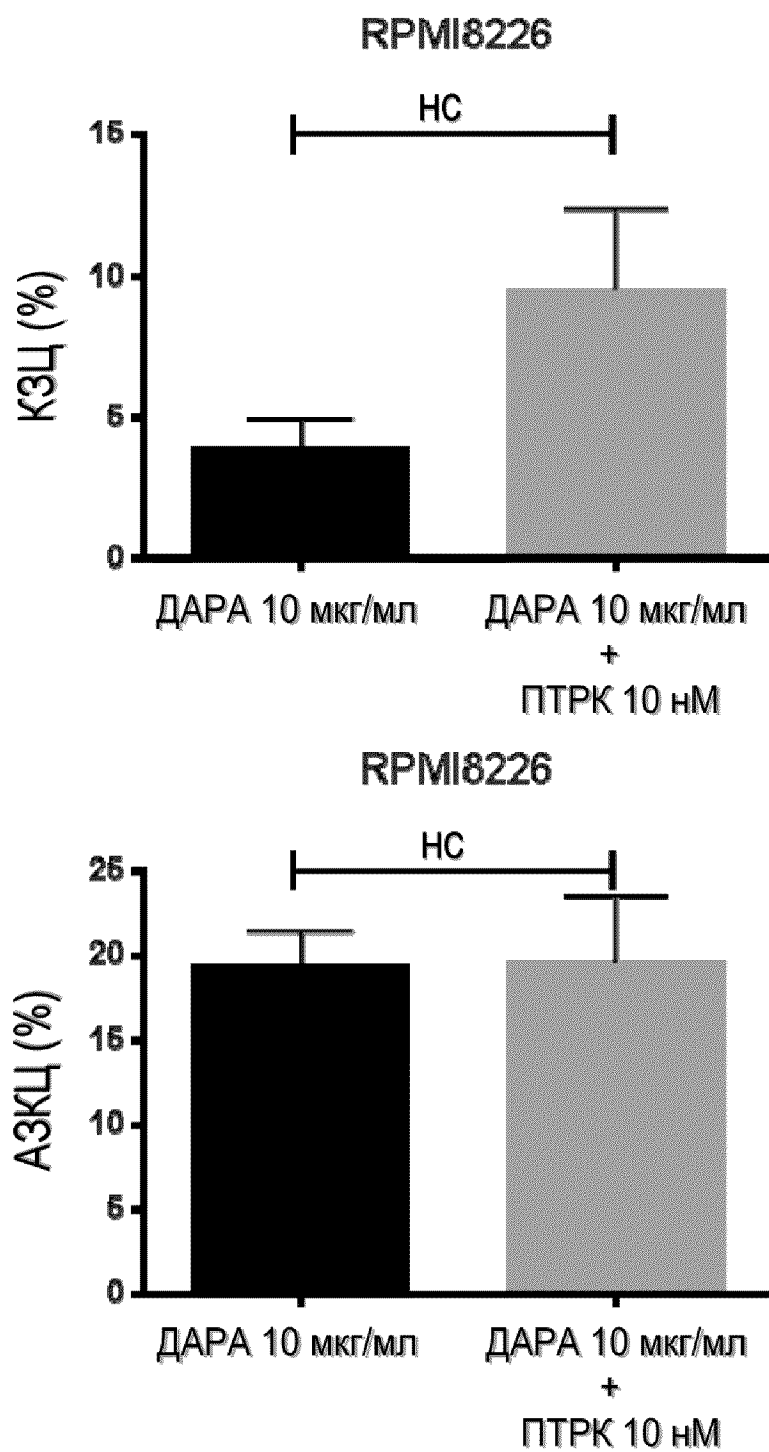
ФИГ. 2



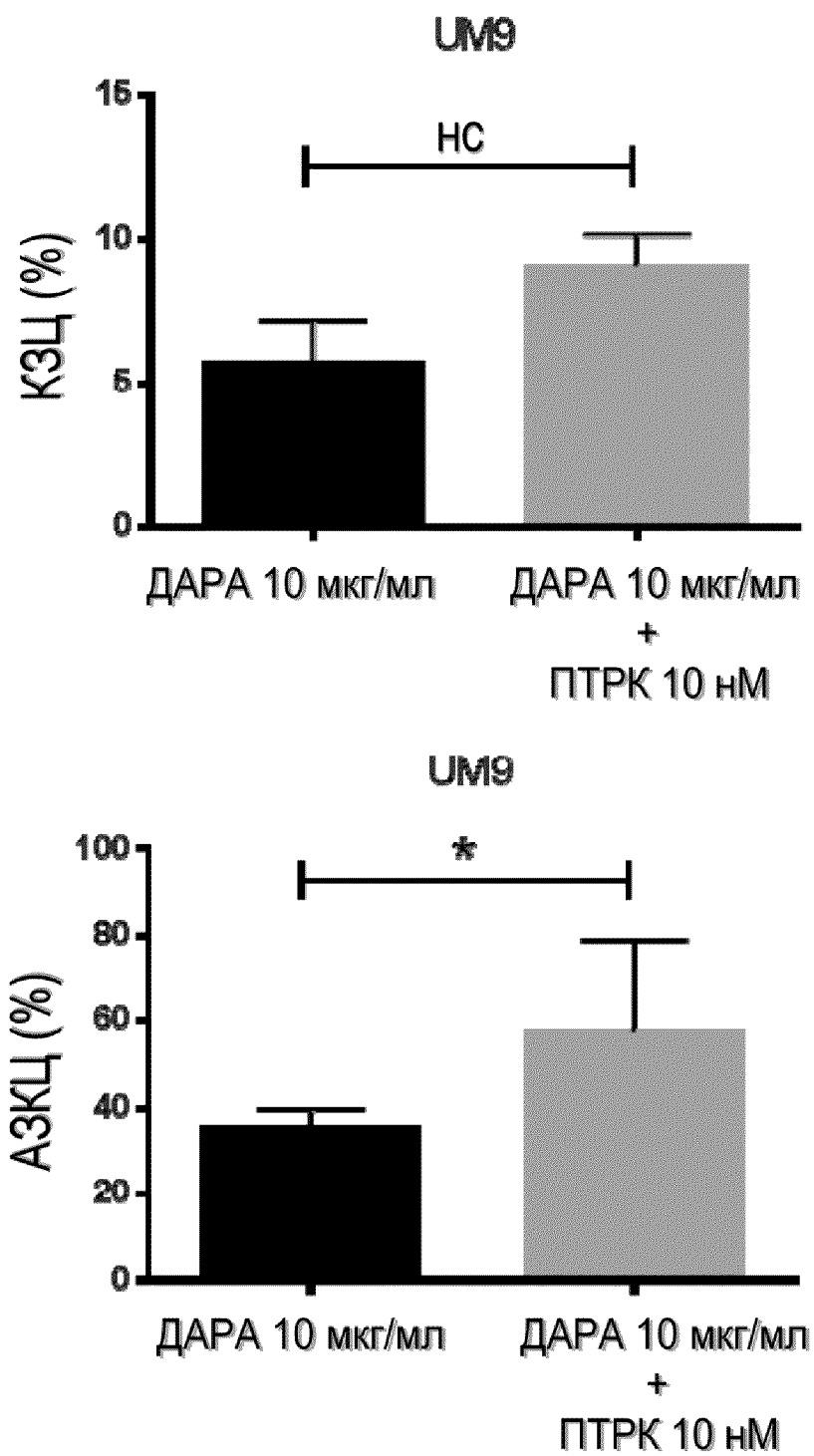
ФИГ. 3А



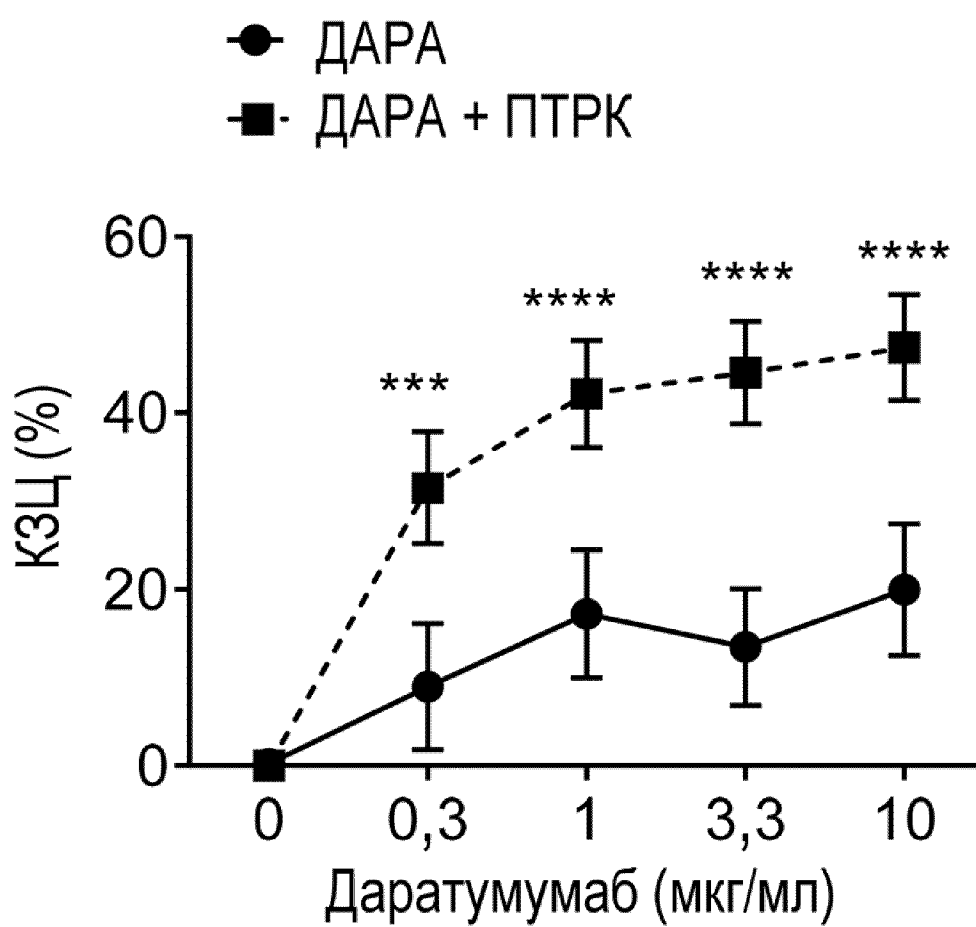
ФИГ. 3В



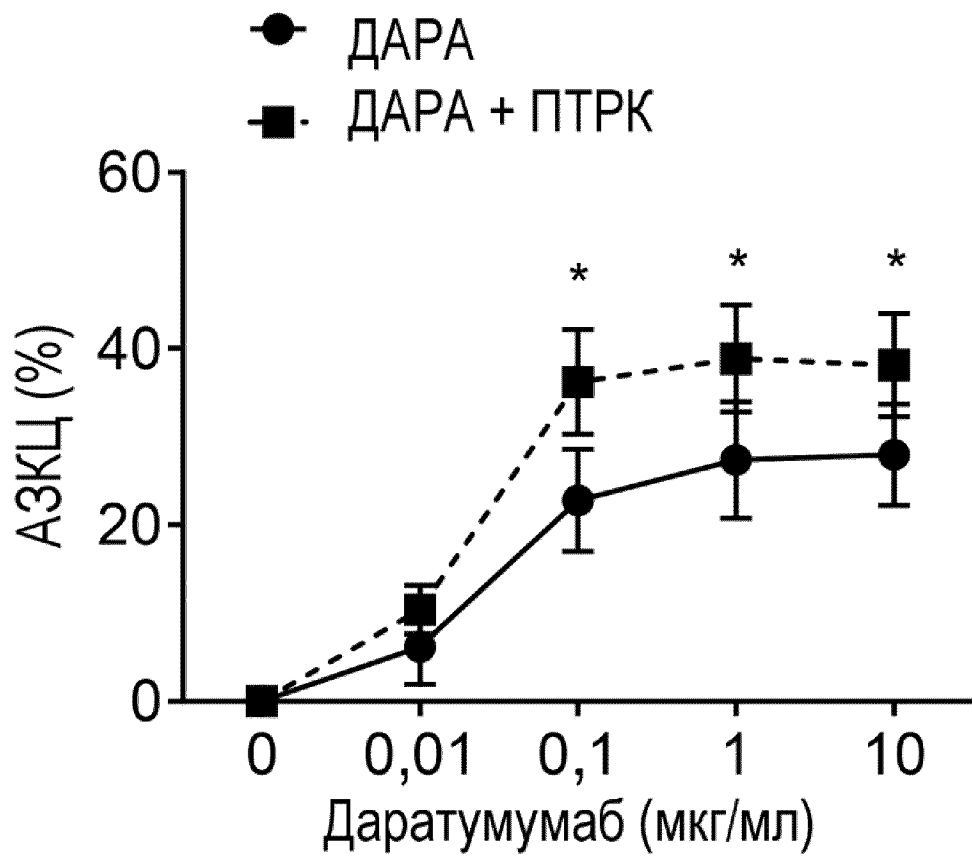
ФИГ. 3С



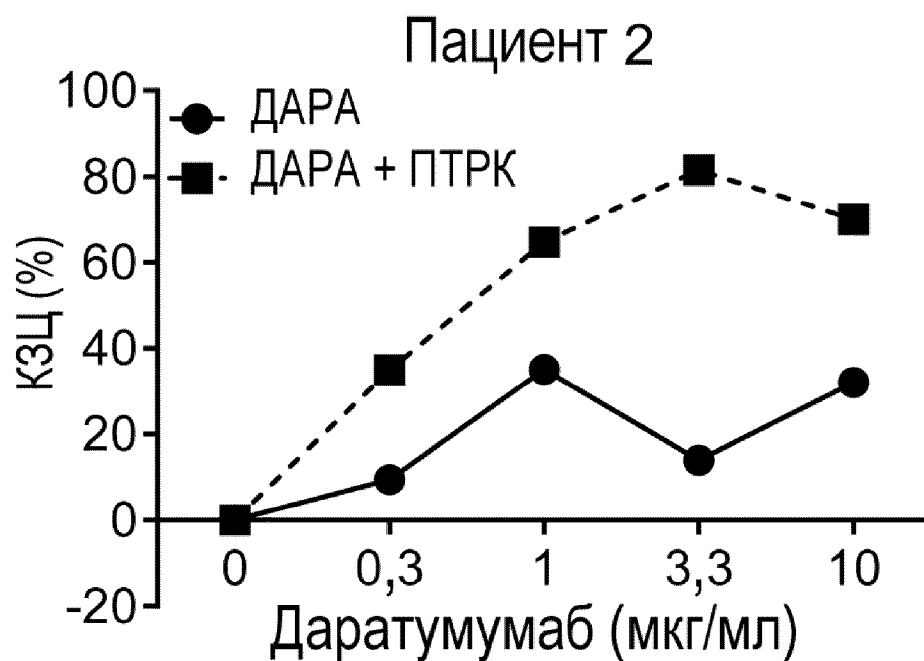
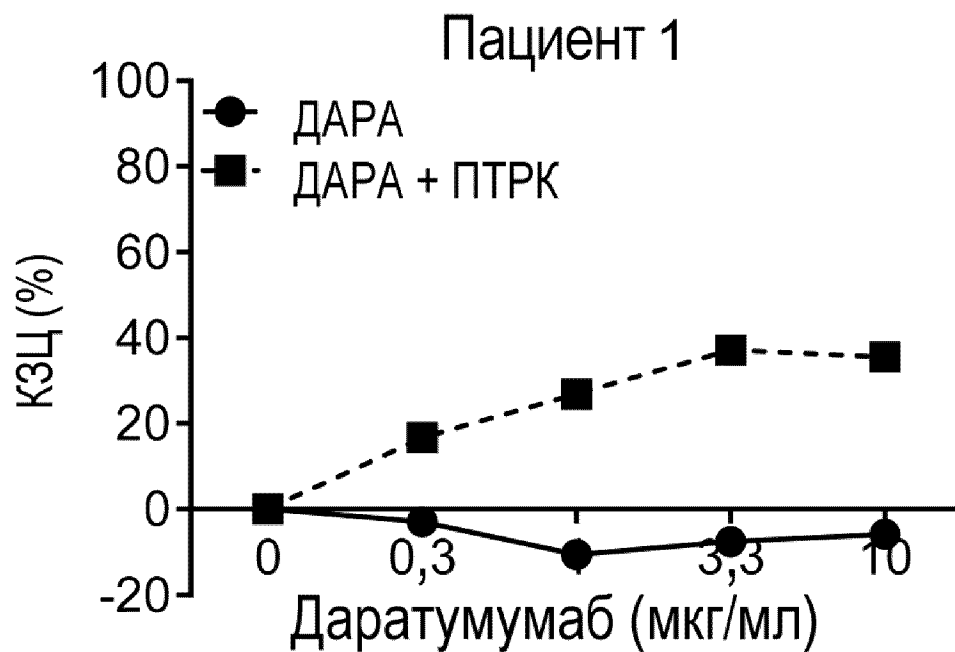
ФИГ. 4А



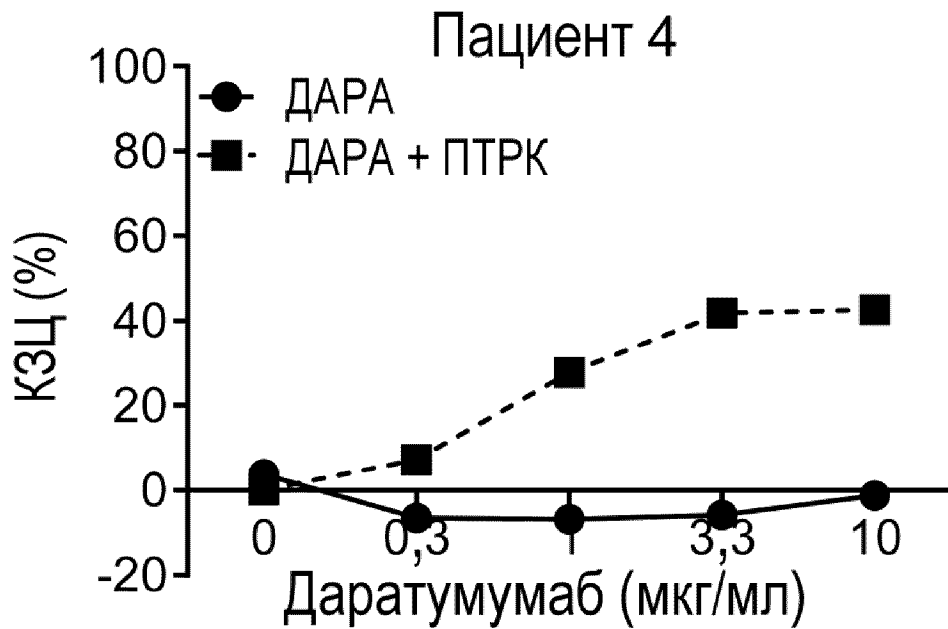
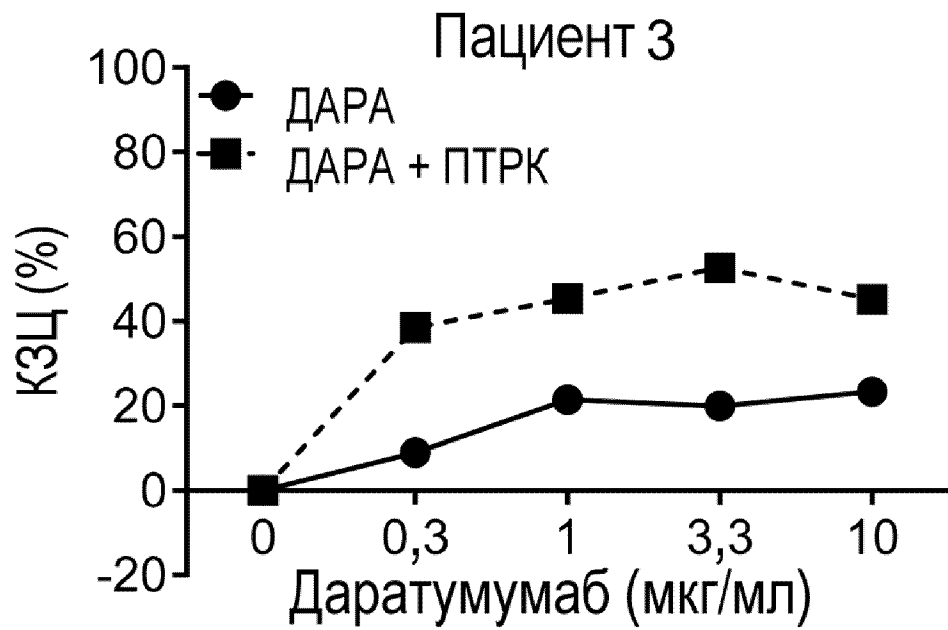
ФИГ. 4В



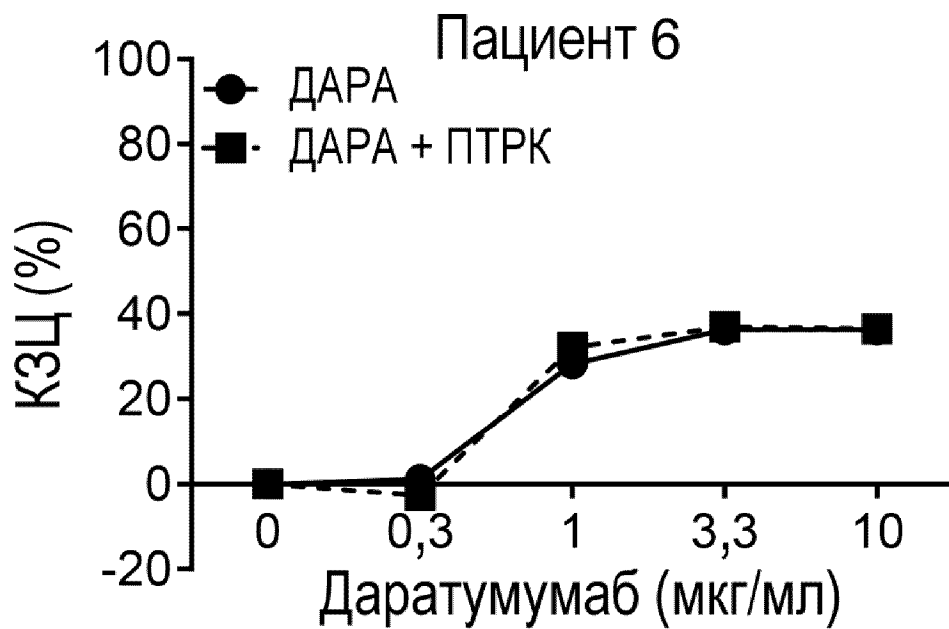
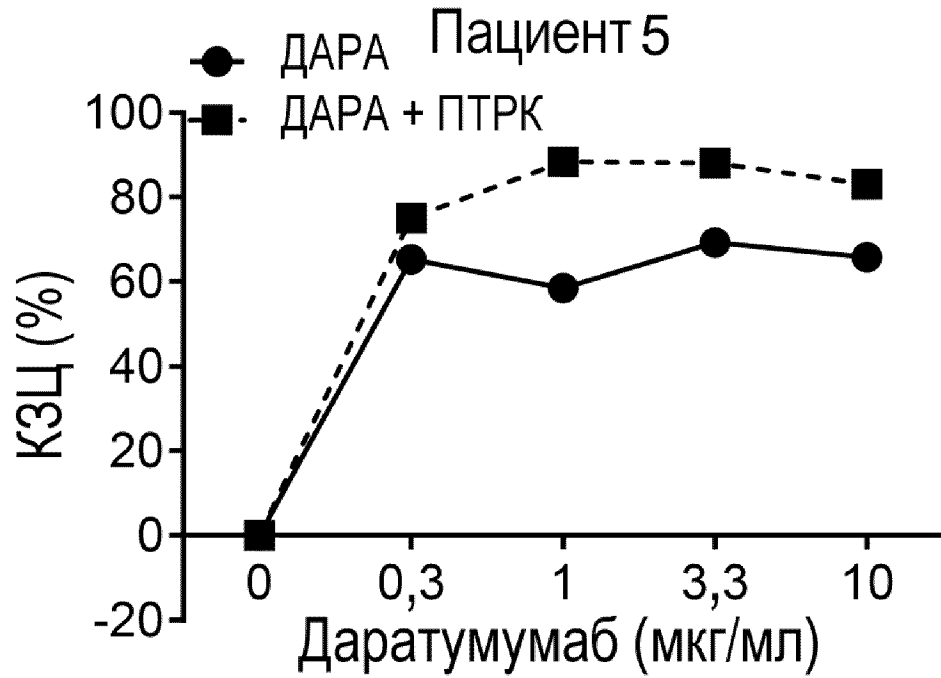
ФИГ. 5А



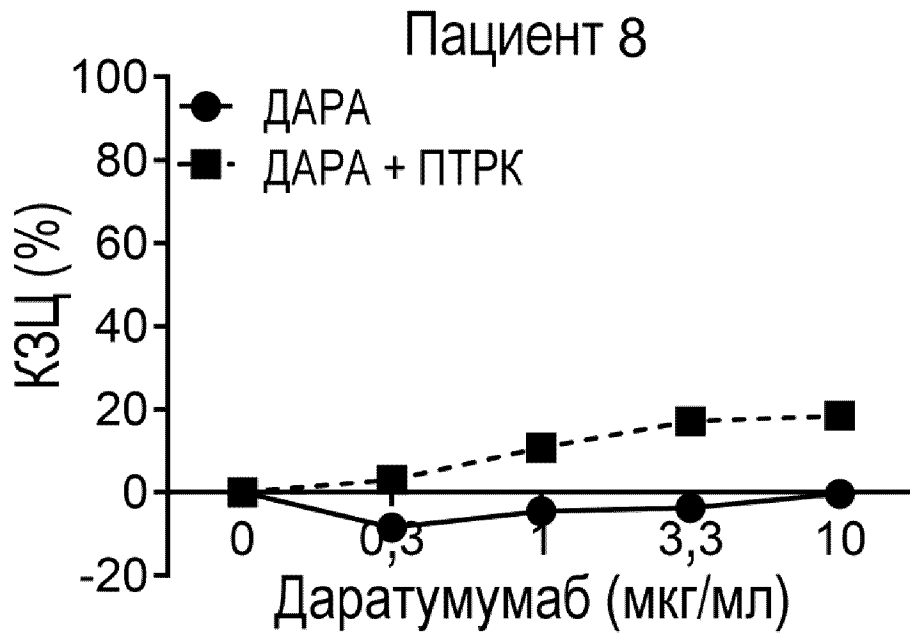
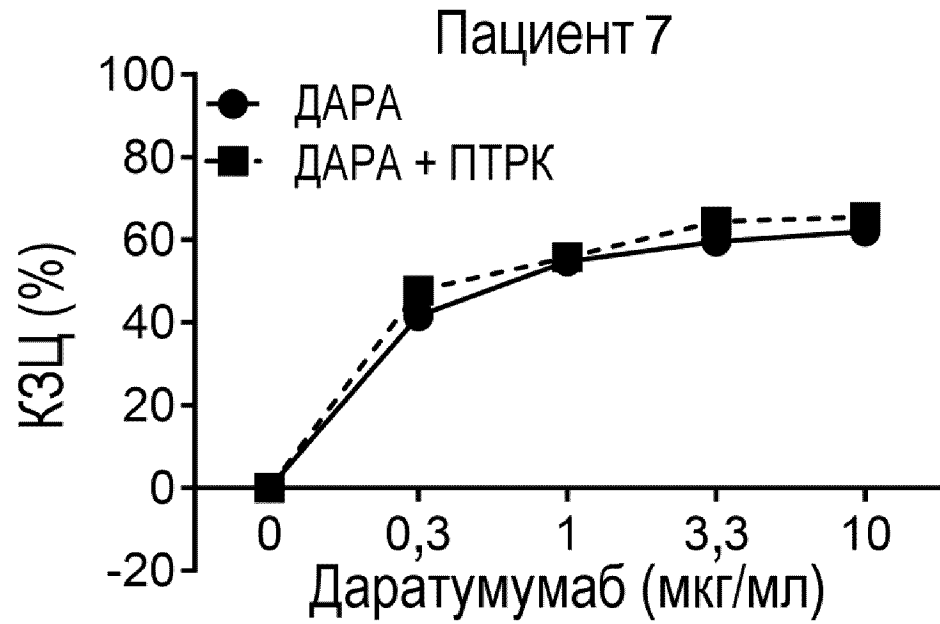
ФИГ. 5В



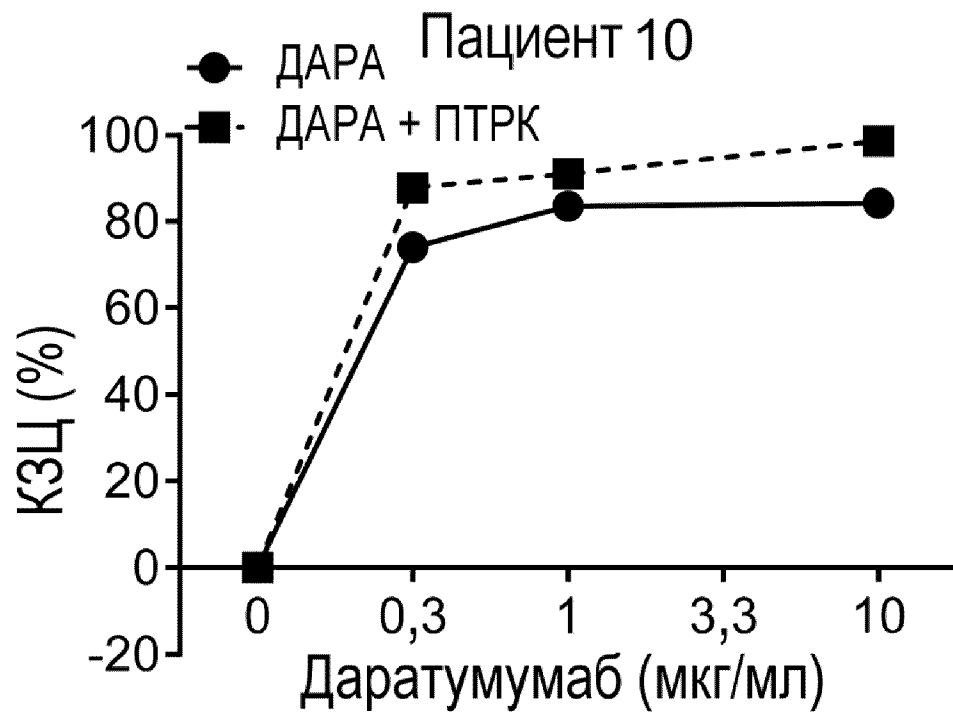
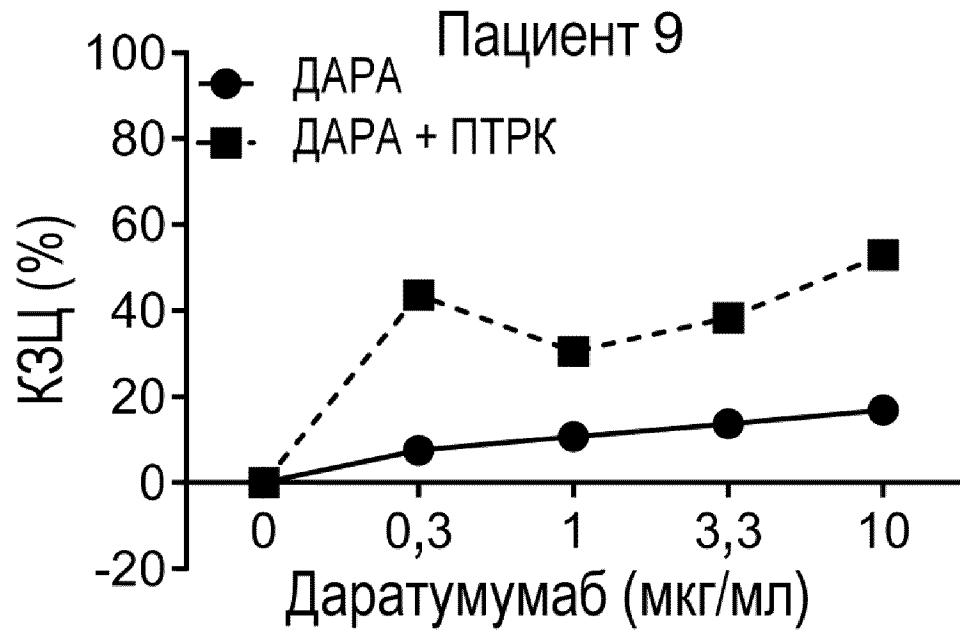
ФИГ. 5С



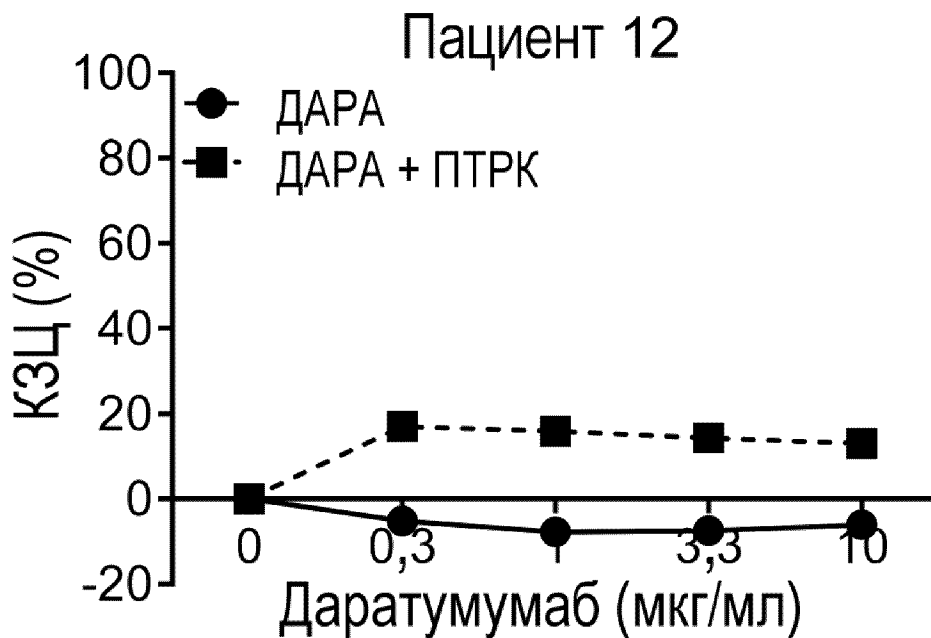
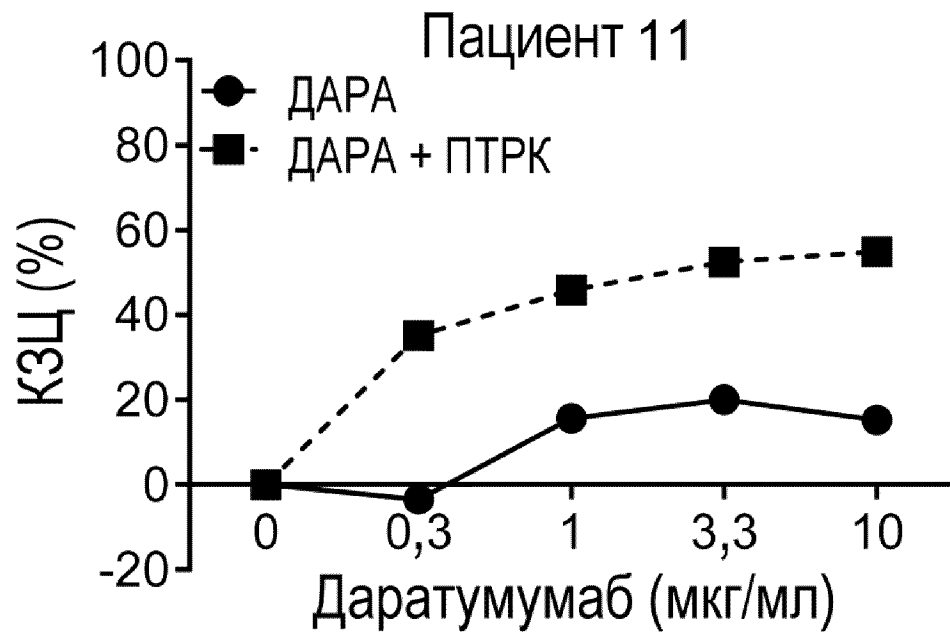
ФИГ. 5D



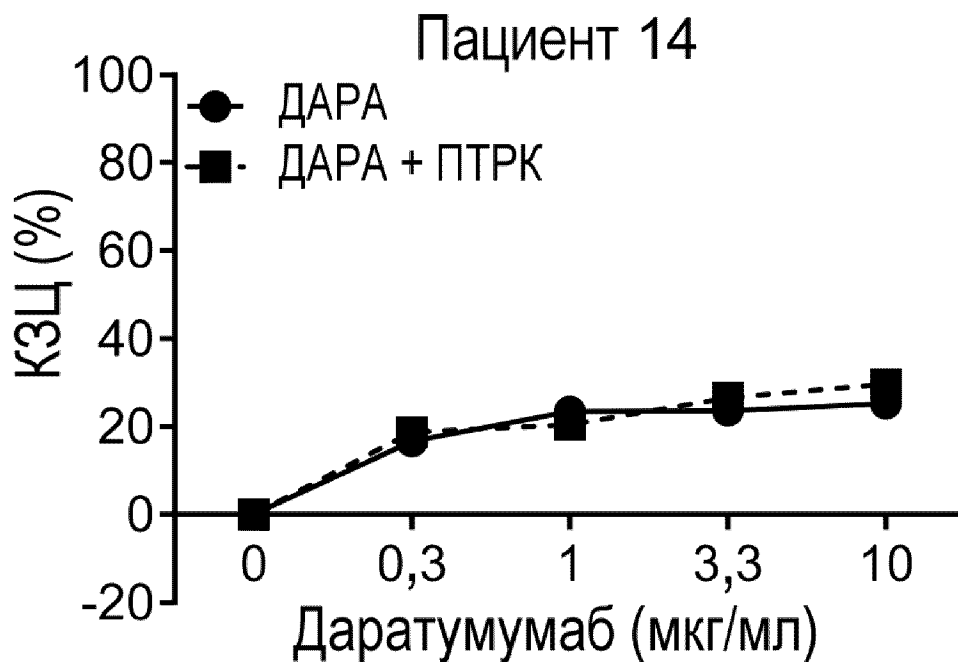
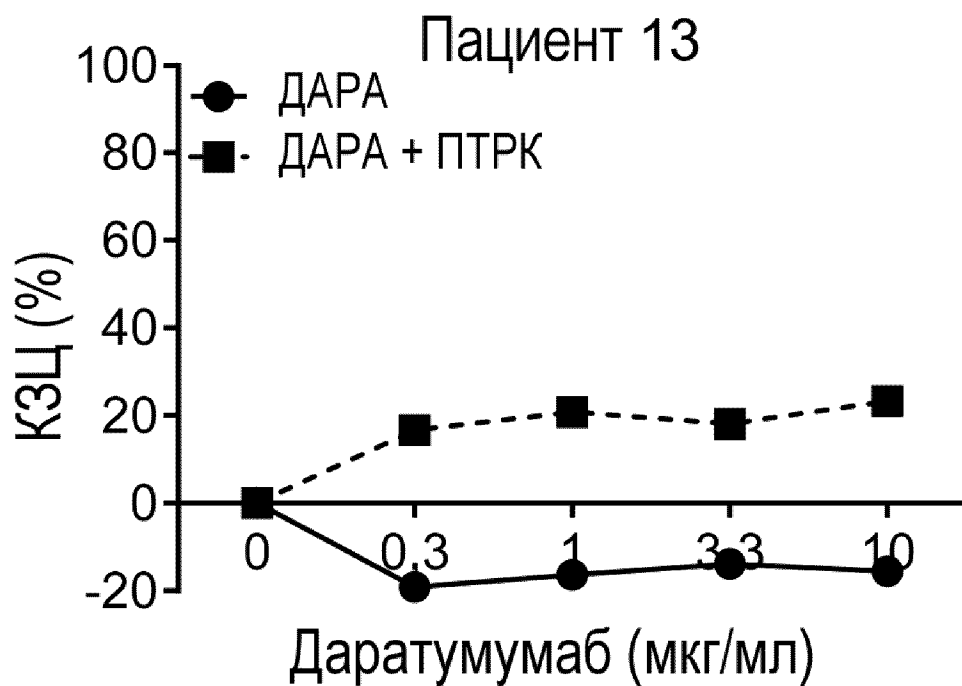
ФИГ. 5Е



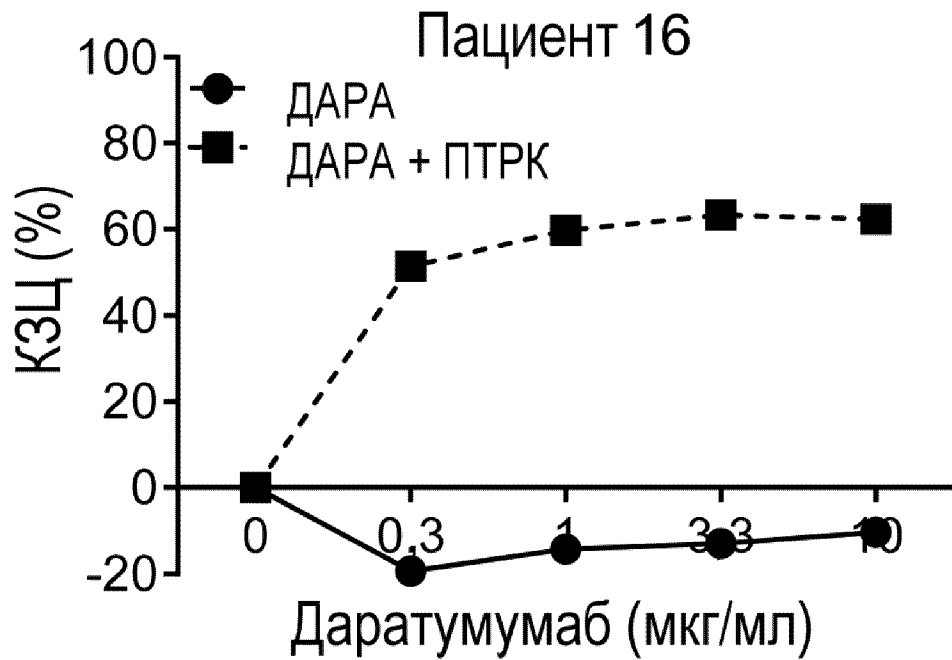
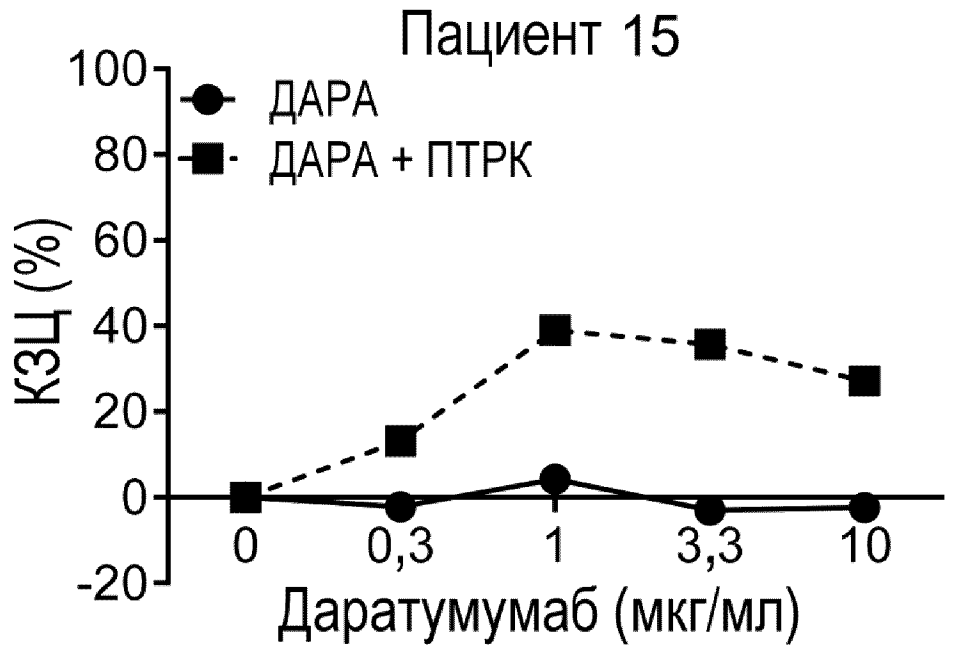
ФИГ. 5F



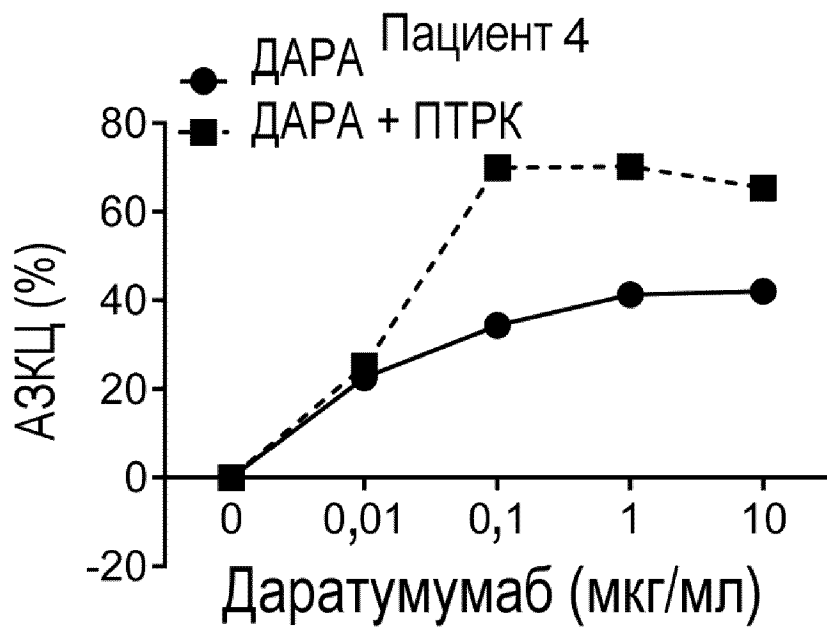
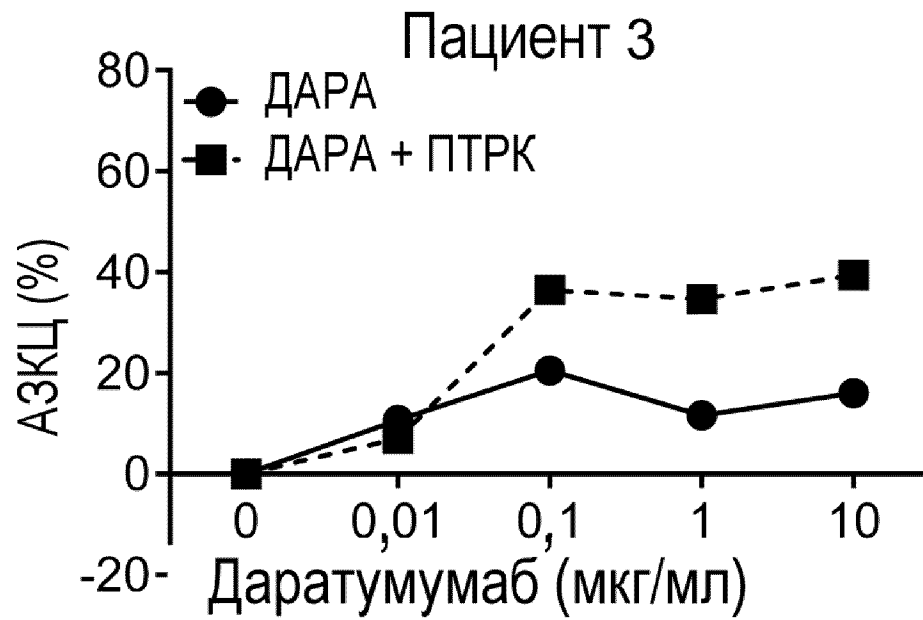
ФИГ. 5G



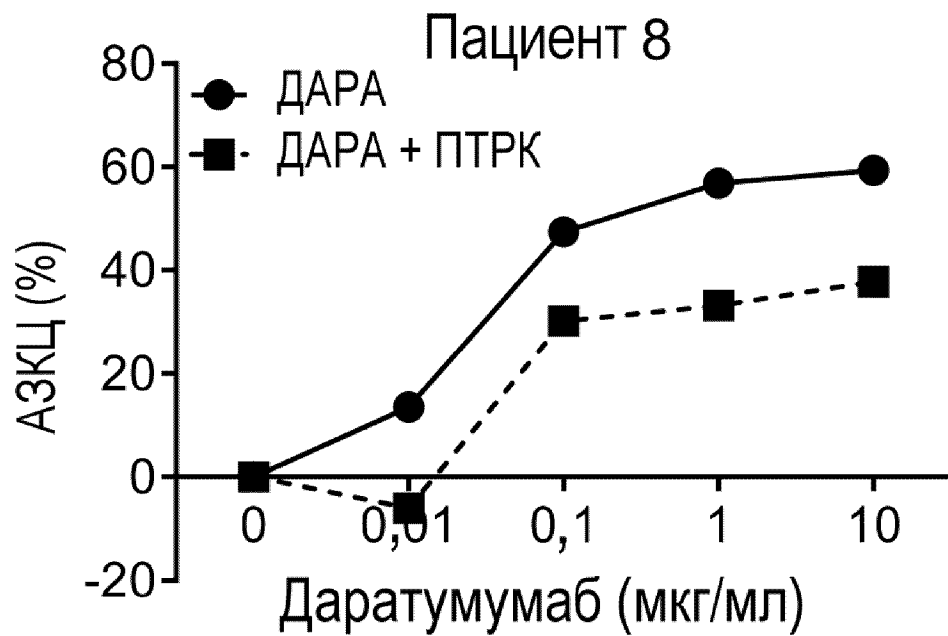
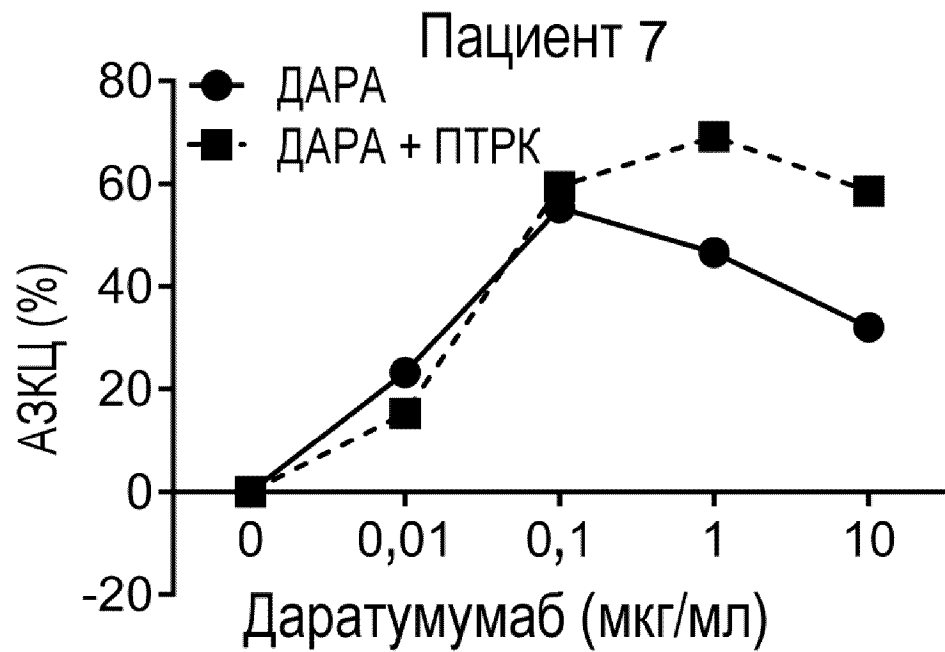
ФИГ. 5Н



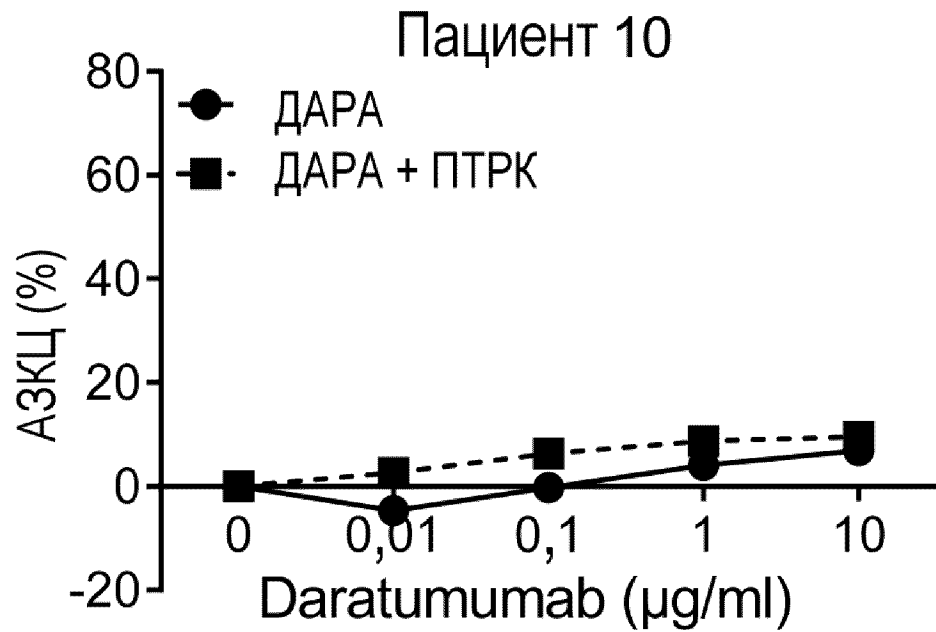
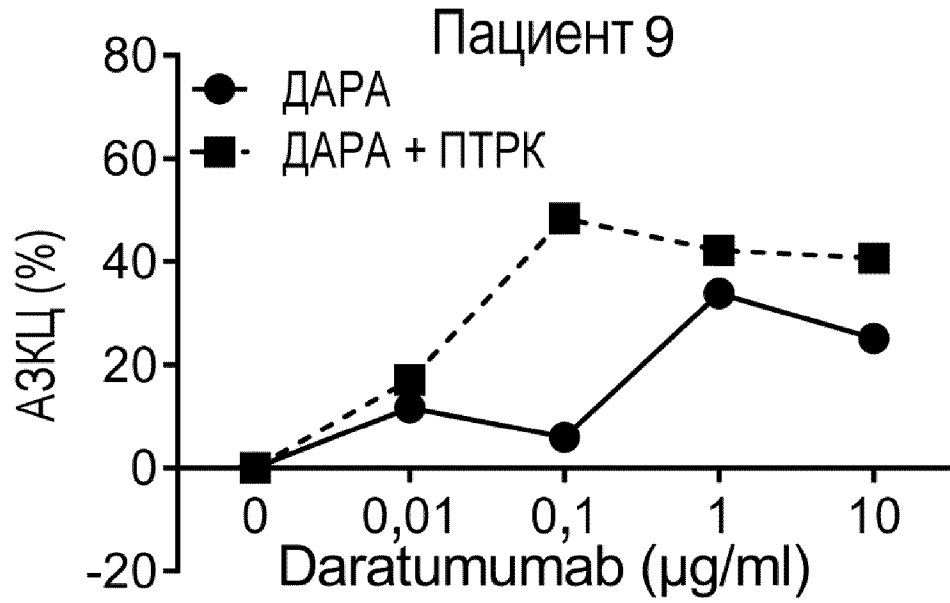
ФИГ. 6А



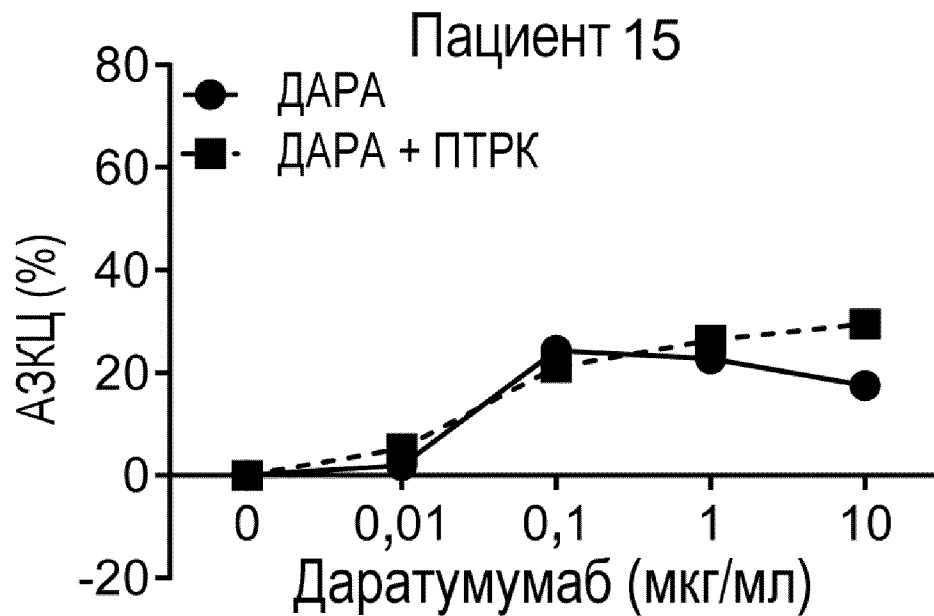
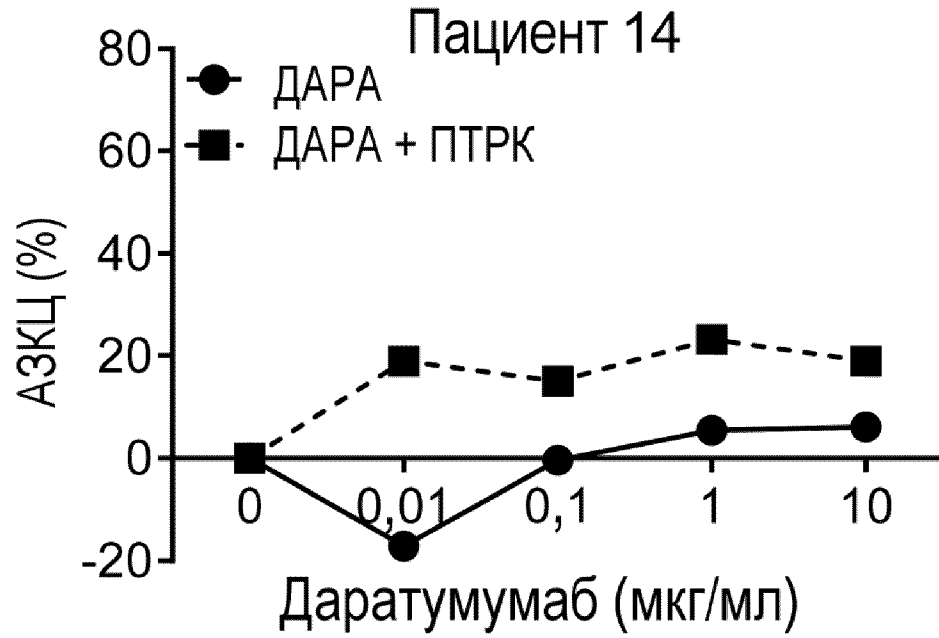
ФИГ. 6В



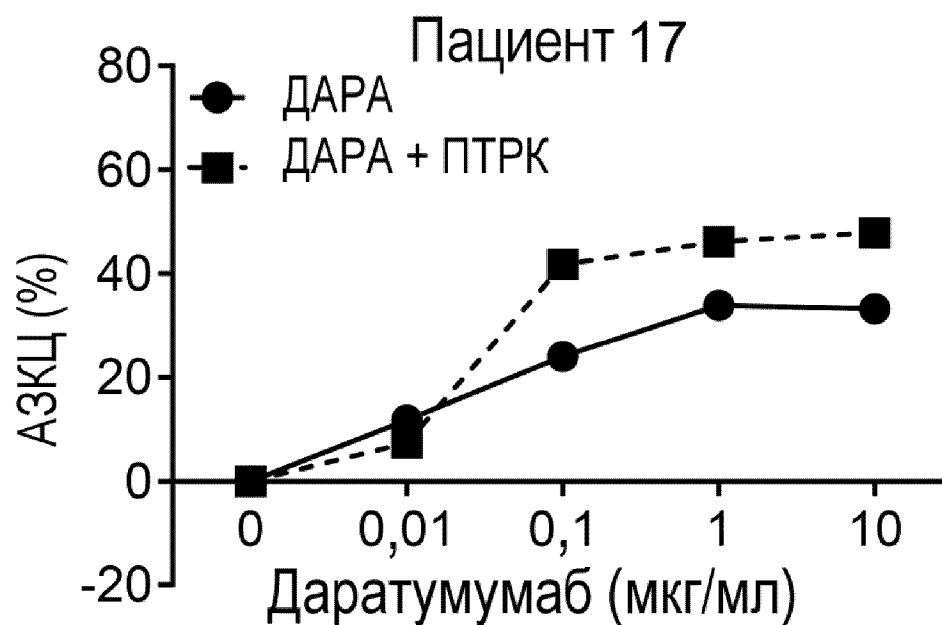
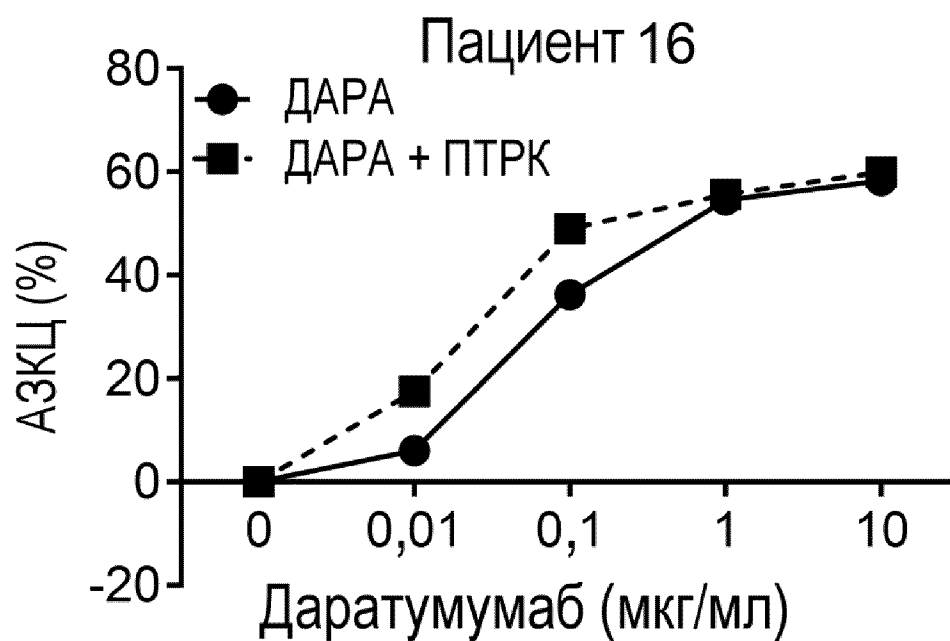
ФИГ. 6С



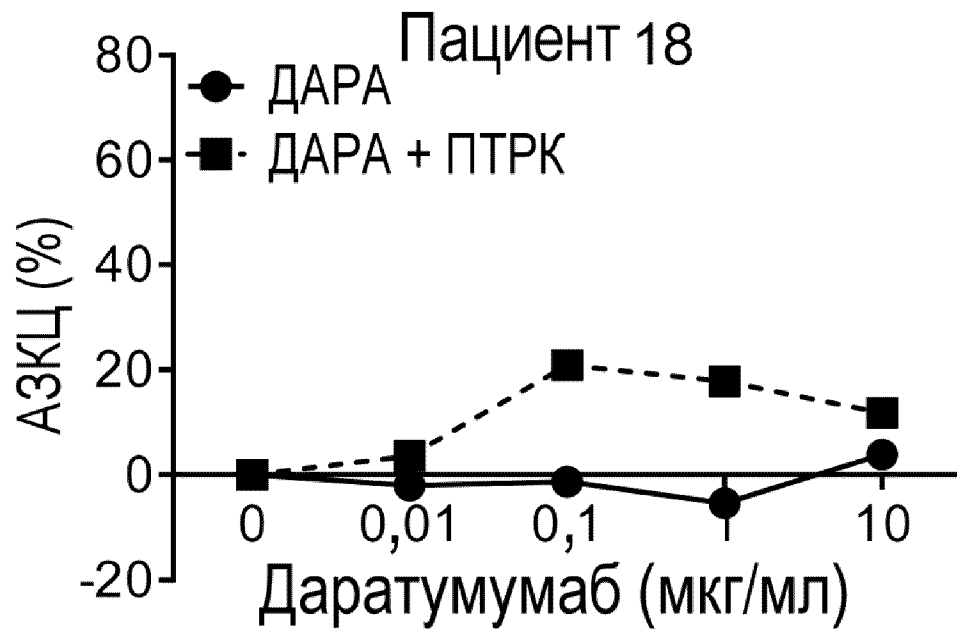
ФИГ. 6D



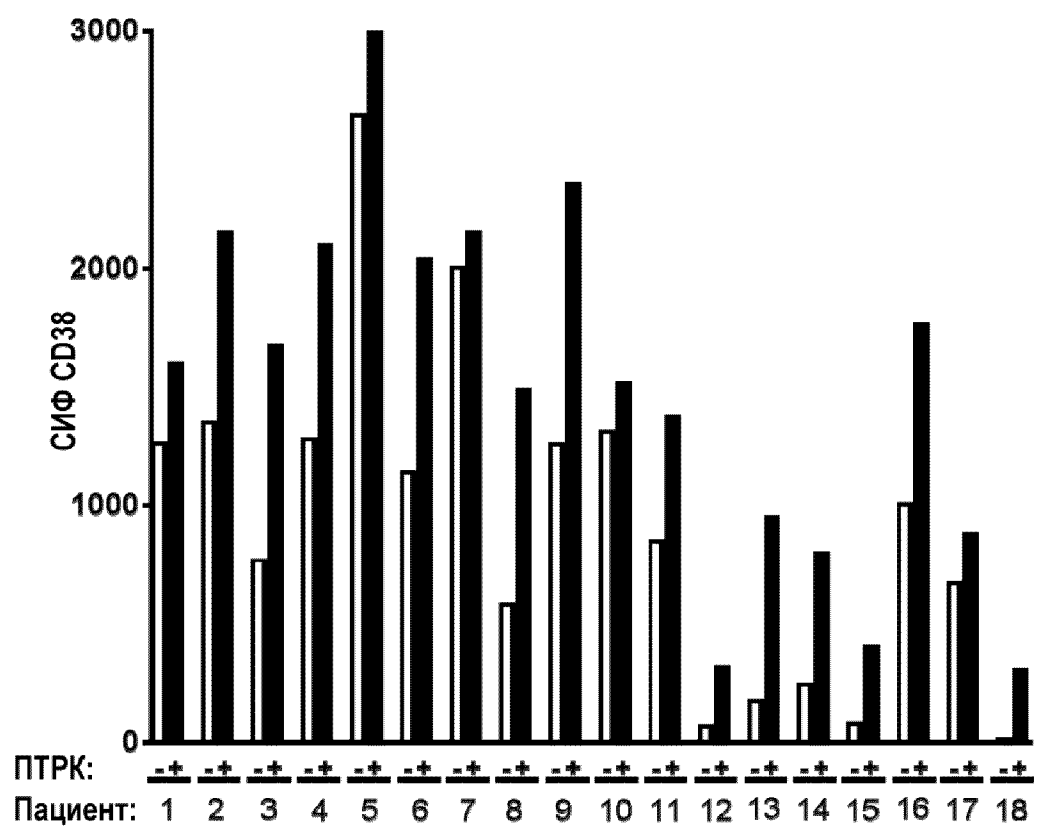
ФИГ. 6Е



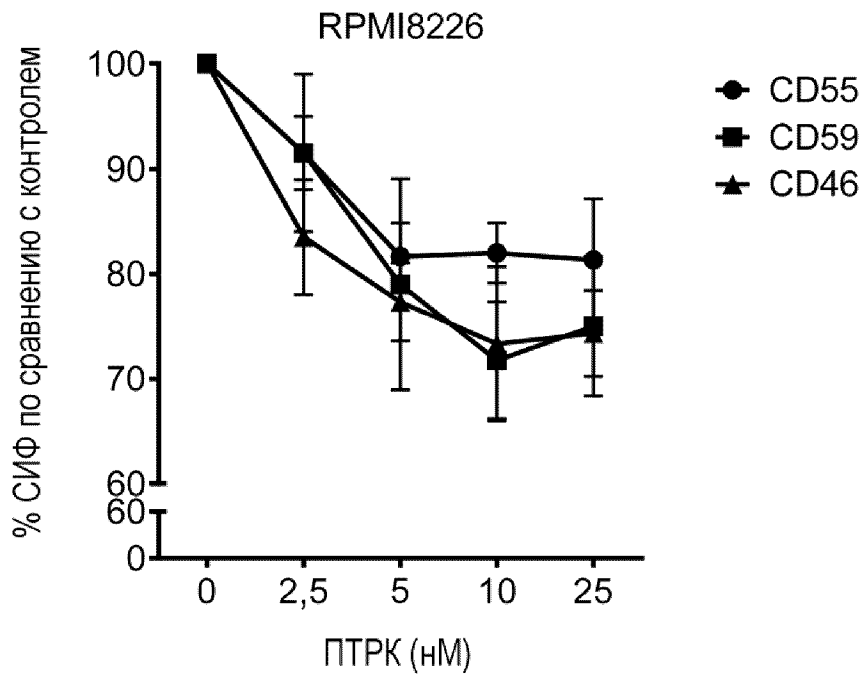
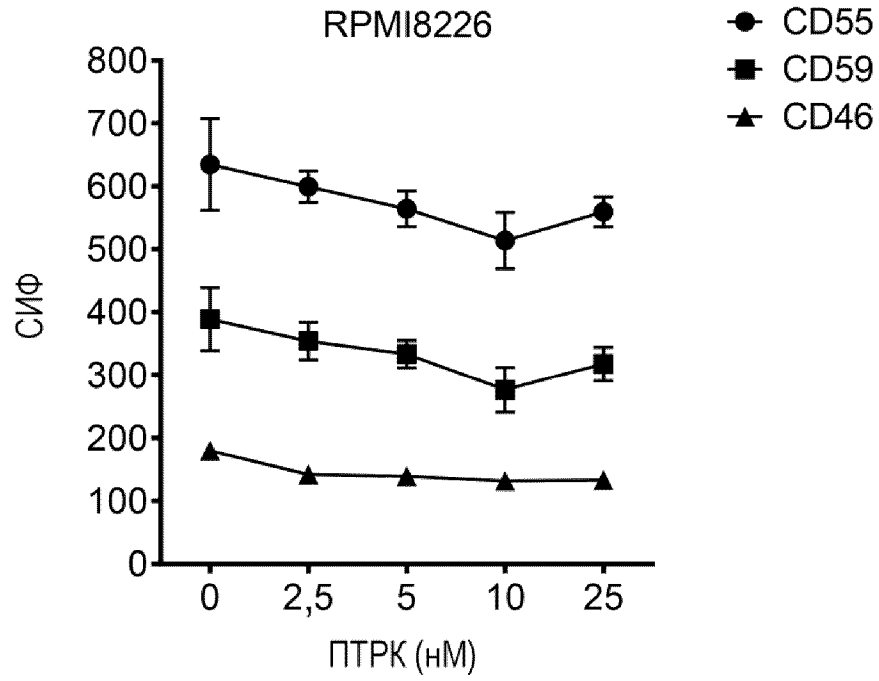
ФИГ. 6F



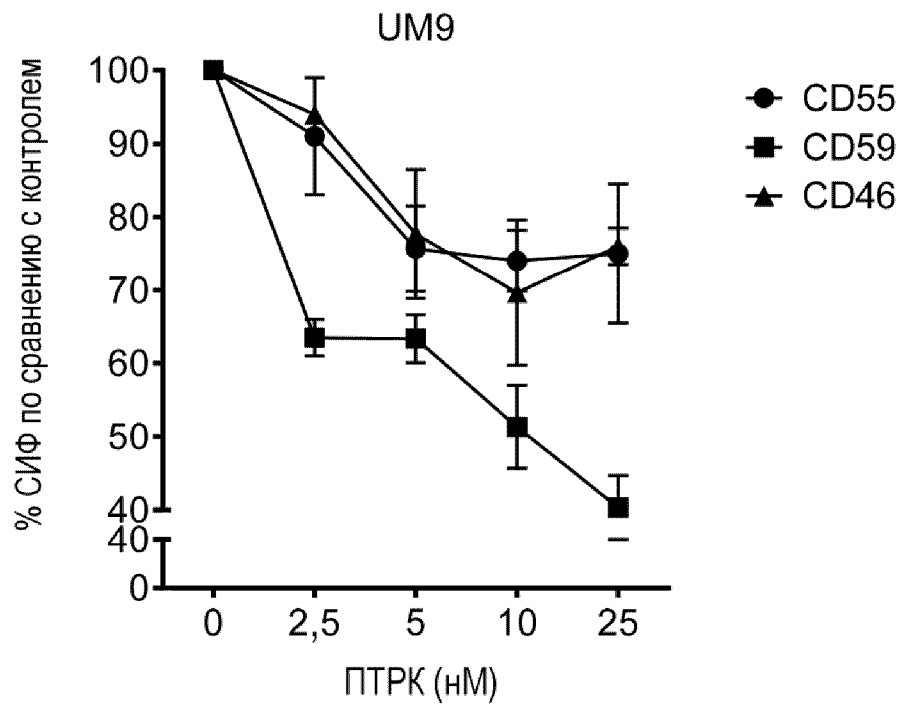
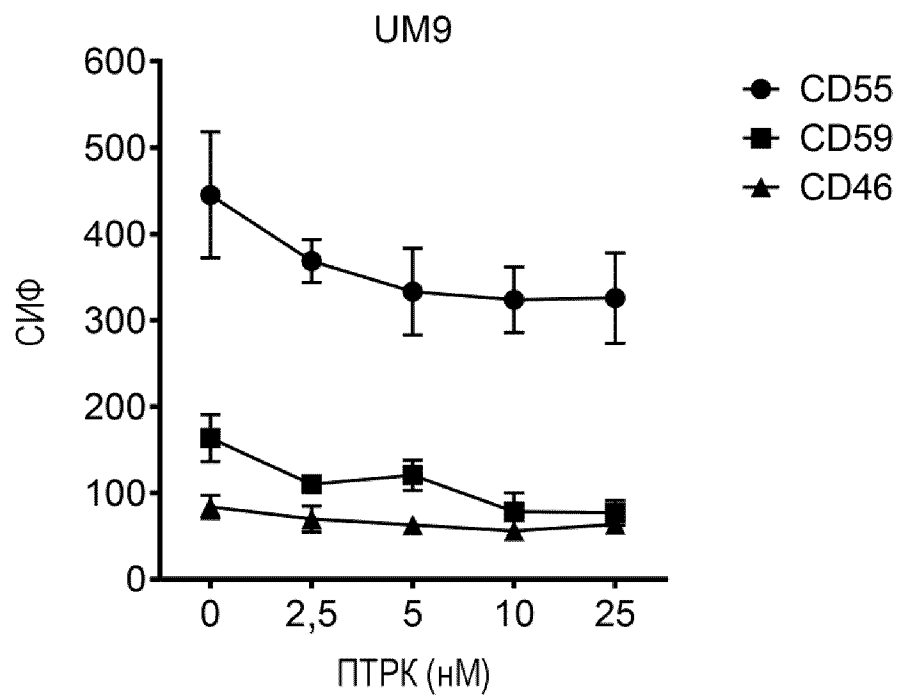
ФИГ. 7



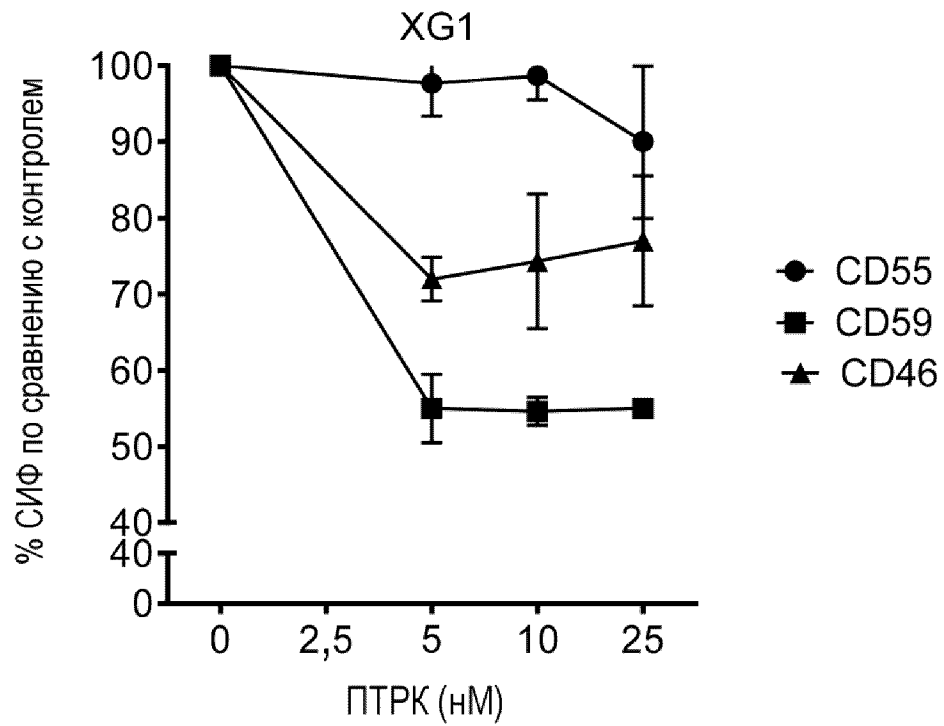
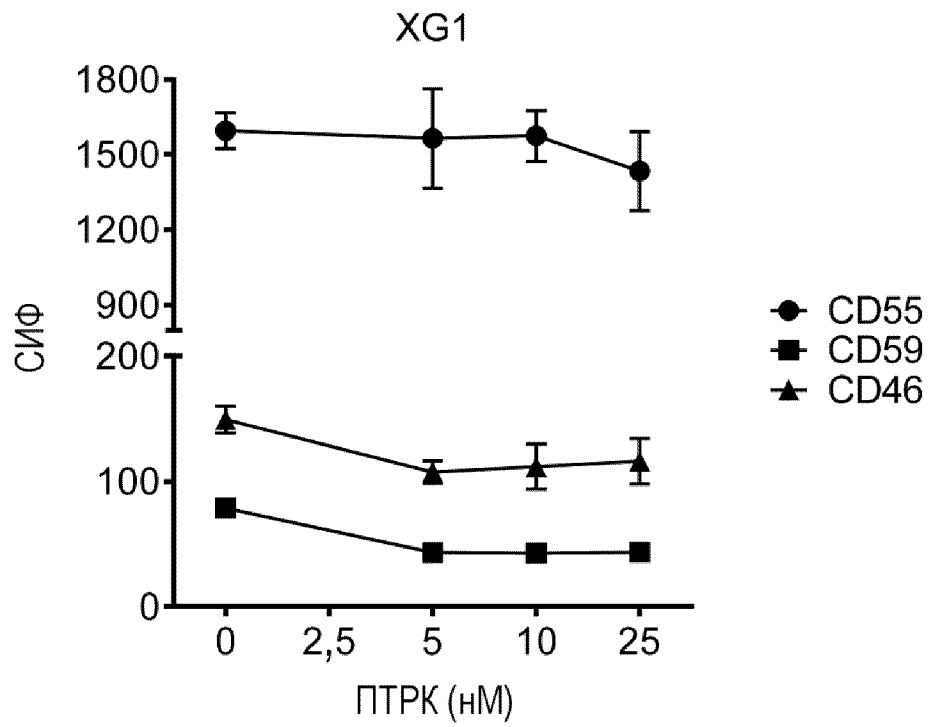
ФИГ. 8А



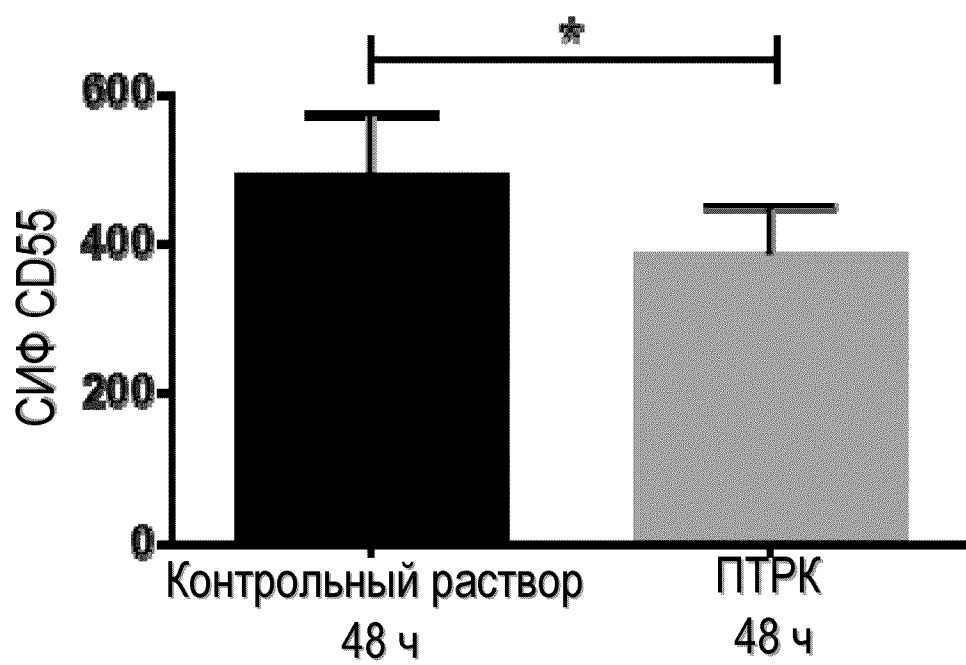
ФИГ. 8В



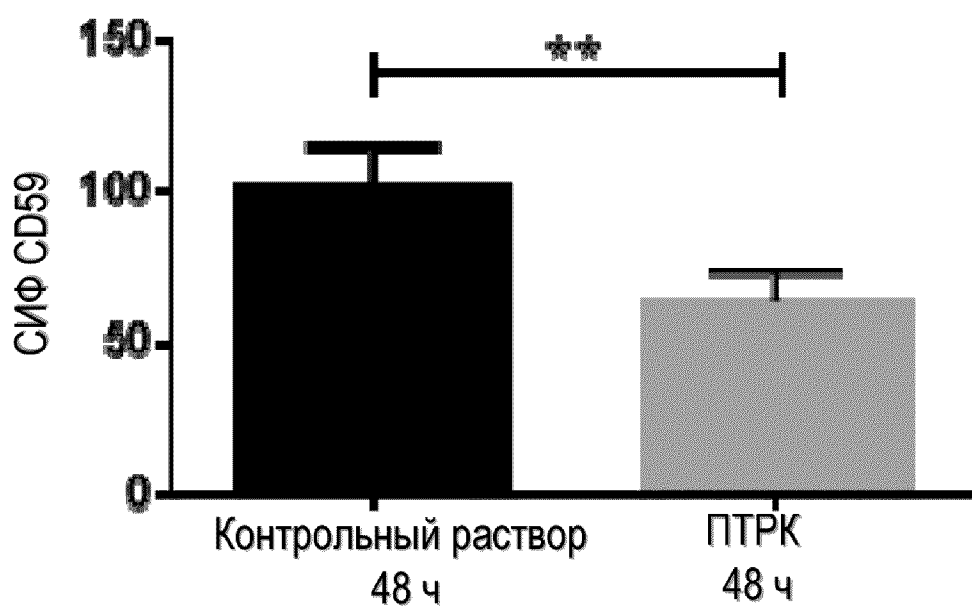
ФИГ. 8С



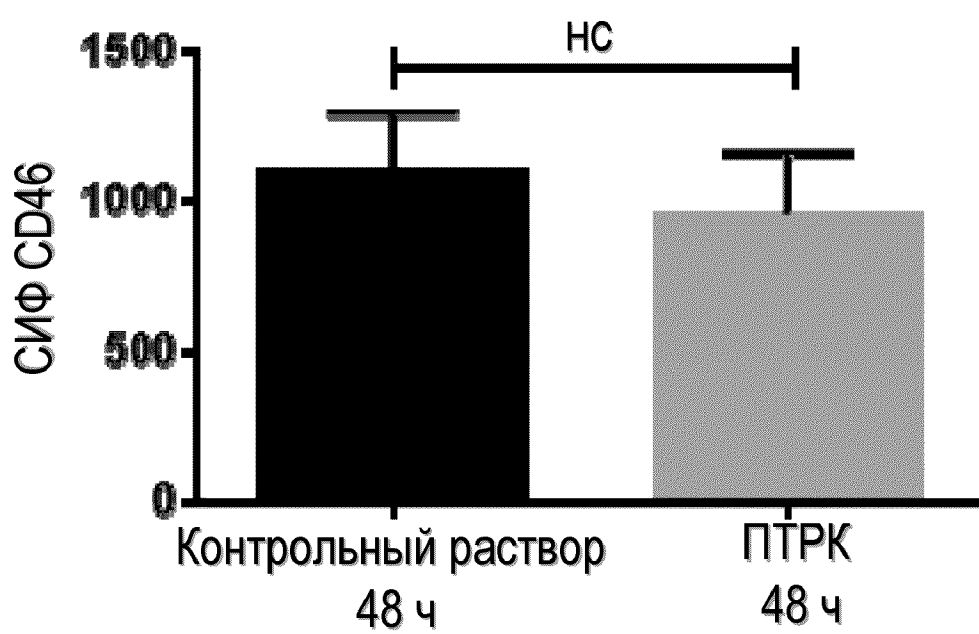
ФИГ. 9А



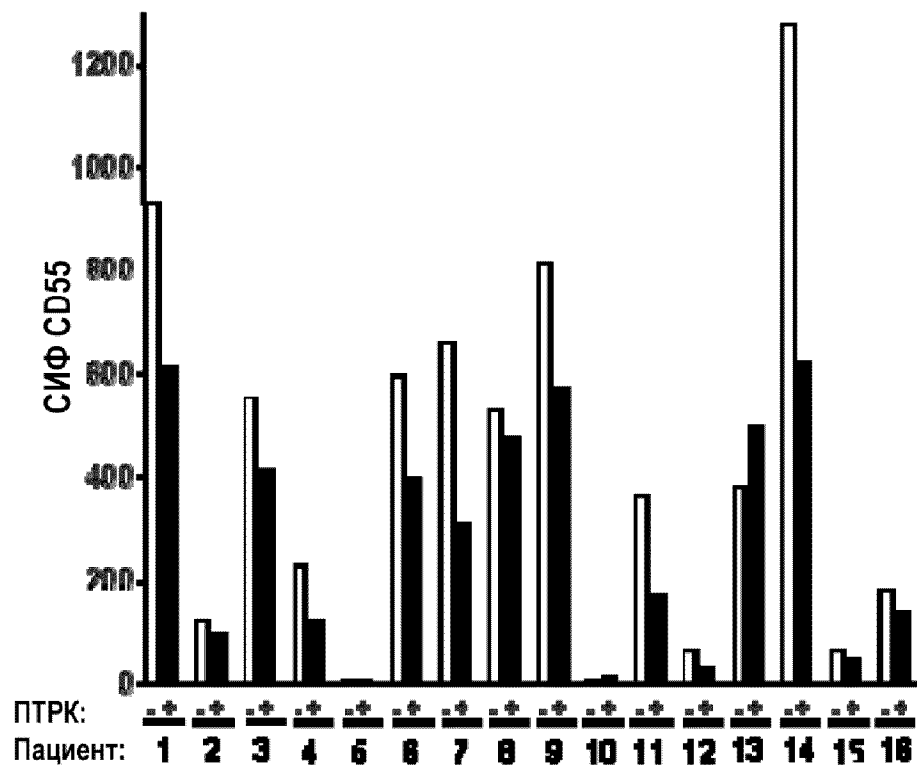
ФИГ. 9В



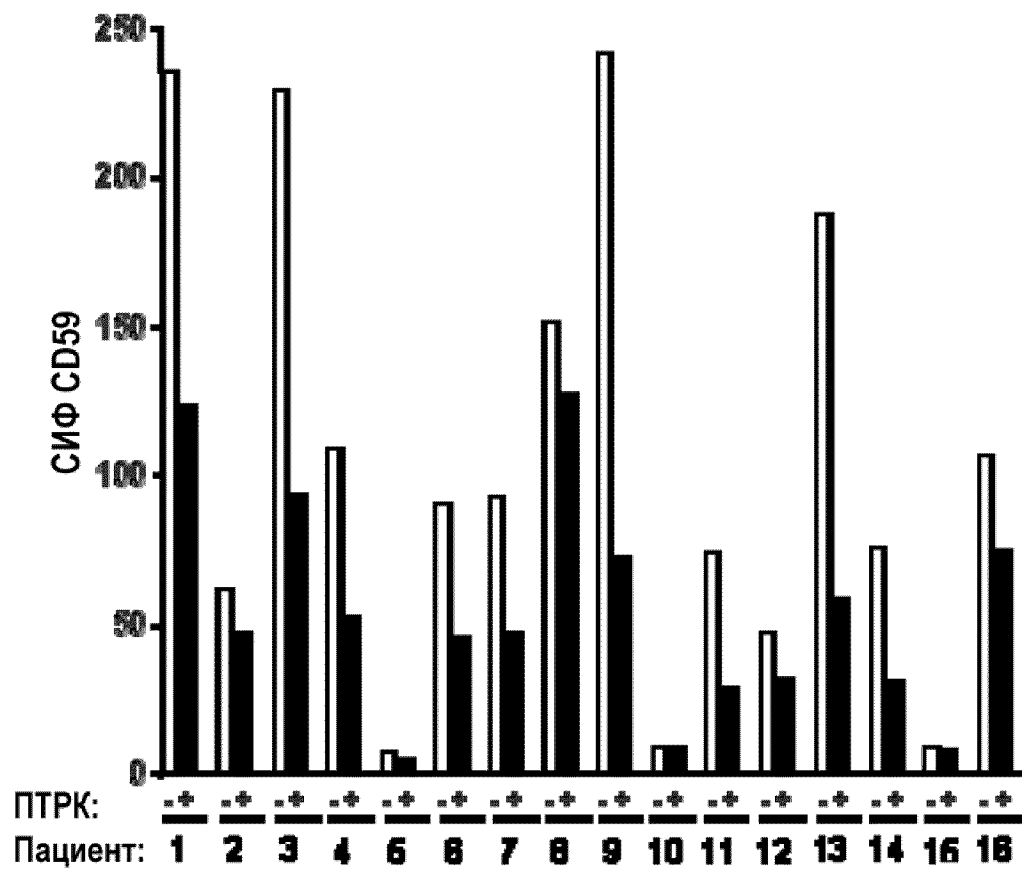
ФИГ. 9С



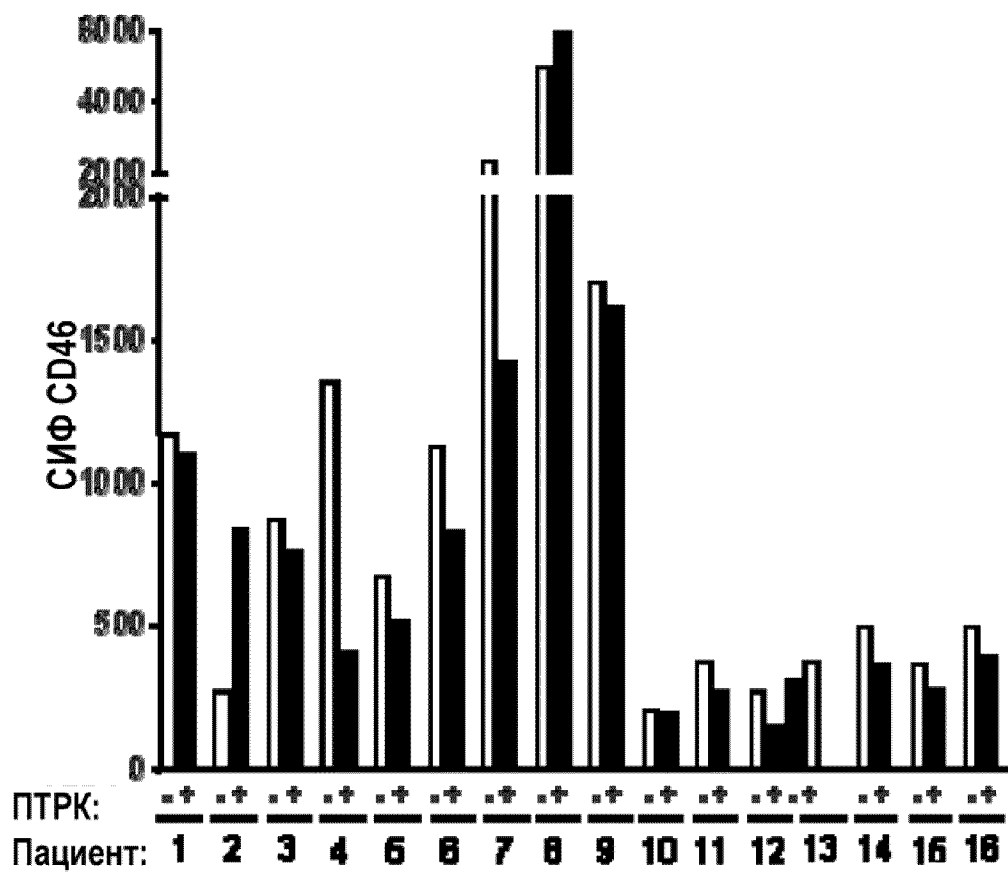
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В



ФИГ. 10С



ФИГ. 11

