(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 034877 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.01

(21) Номер заявки
200970317

(22) Дата подачи заявки
2007.09.26

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD38, И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УКАЗАННОМ СПОСОБЕ

(31) **PA200601232; 60/847,329**
(32) **2006.09.26**
(33) **DK; US**
(43) **2009.10.30**
(86) **PCT/DK2007/000418**
(87) **WO 2008/037257 2008.04.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Винкел Ян ван де, Паррен Пауль, Граус Иво, Опринс Юдит, Верс Мишель де, Вюгт Мартин ван (NL), Бодсгор Оле, Лисбю Стен (DK)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) PEIPP M. ET AL.: "FULLY HUMAN CD38 ANTIBODIES EFFICIENTLY TRIGGER ADCC OF MULTIPLE MYELOMA CELL LINES AND PRIMARY TUMOR CELLS", BLOOD, W.B. SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 106, no. 11, PART 1, November 2005 (2005-11), page 944A, ABSTRACT NO 3377, XP009069301, ISSN: 0006-4971, abstract

PEIPP M. ET AL.: "Fully Human CD38 Antibodies Efficiently Trigger ADCC an Fully Human CD38 Antibodies Efficiently Trigger ADCC and CDC of Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia Cells", AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY POSTER PRESENTATION 2005, [Online] 2005, XP002473215, Retrieved from the Internet: URL:http://www.genmab.com/upload/poster_ash_2005_monday_05-12-2005.pdf> [retrieved on 2008-03-18], abstract

DE WEERS M. ET AL.: "HuMax-CD38, a new human CD38 monoclonal antibody, effectively mediates killing of multiple myeloma and plasma cell leukemia cells", 1ST JOINT MEETING OF EUROPEAN NATIONAL SOCIETIES OF IMMUNOLOGY. 6-9 SEPT. 2006, PARIS, FRANCE. POSTER, [Online] 2006, XP002473216, Retrieved from the Internet: URL:http://www.genmab.com/upload/paris_sept_2006_michel_de_weers.pdf> [retrieved on 2008-03-18], abstract

WO-A-9962526

MALONEY D.G. ET AL.: "ANTIBODY THERAPY FOR TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA", SEMINARS IN HEMATOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 36, no. 1, SUPPL 3, January 1999 (1999-01), pages 30-33, XP000857401, ISSN: 0037-1963, abstract, page 30, right-hand column, paragraph 3FF

WO-A-2006099875
WO-A-2005103083
WO-A-2005044855

JOHNSON ET AL.: "Primary plasma cell leukemia: morphologic, immunophenotypic, and cytogenetic features of 4 cases treated with chemotherapy and stem cell transplantation", ANNALS OF DIAGNOSTIC PATHOLOGY, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 10, no. 5, 15 September 2006 (2006-09-15), pages 263-268, XP005644006, ISSN: 1092-9134, the whole document

ELLIS JONATHAN H. ET AL.: "Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 155, no. 2, 1995, pages 925-937, XP002146232, ISSN: 0022-1767, the whole document

DONOVAN K.A. ET AL.: "BINDING AND INTERNALIZATION OF AN ANTIBODY ENGINEERED ANTI-CD38 SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENT (SCFV) BY HUMAN MYELOMA CELLS", BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 90, no. 10, SUPPL 1, 15 November 1997 (1997-11-15), page 88A, XP000857386, ISSN: 0006-4971, the whole document

HOSHINO S.-I. ET AL.: "Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD+ glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 158, no. 2, 15 January 1997 (1997-01-15), pages 741-747, XP002389875, ISSN: 0022-1767, the whole document

AUSIELLO C.M. ET AL.: "Functional topography of discrete domains of human CD38", TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 56, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 539-547, XP002389874, ISSN: 0001-2815, the whole document

(57) Изобретение касается нового способа лечения опухоли при помощи комбинированной терапии, включающей антитело, связывающееся с CD38, кортикостероид и некортикостероидное химиотерапевтическое средство.

034877 B1

034877 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается лечения рака при помощи комбинированной терапии, включающей антитело, связывающееся с CD38, кортикостероид и некортикостероидное химиотерапевтическое средство.

Сведения о предшествующем уровне техники

Множественная миелома представляет собой злокачественное перерождение В-клеток, которое характеризуется латентным накоплением в костном мозге секреторных плазмоцитов с низким индексом пролиферации и продолжительным сроком жизни. В конечном счете, заболевание поражает кости и костный мозг, что приводит к образованию множественных опухолей и повреждений по всему скелету.

Примерно 1% всех случаев рака и чуть больше 10% гематологических опухолей могут относиться к множественной миеломе (ММ). Число новых случаев ММ возрастает среди пожилых, причем медианное значение возраста на момент установления диагноза составляет 61 год.

Доступные в настоящее время способы терапии включают химиотерапию, пересадку стволовых клеток, Thalomid® (талидомид), Velcade® (бортезомиб), Aredia® (памидронат) и Zometa® (золедроновая кислота). Текущие методики лечения, которые включают комбинирование химиотерапевтических средств, таких как винкристин, BCNU, мелфалан, циклофосфамид, адриамицин и преднизон или дексаметазон, дают полную ремиссию только в 5% случаев, а медиана срока жизни составляет примерно 36-48 месяцев со времени диагноза. Последние достижения с использованием химиотерапии в высоких дозах с последующей аутологической трансплантацией костного мозга или мононуклеарных клеток периферической крови повысили уровень полной ремиссии и продолжительность ремиссии. Но в целом срок жизни лишь слегка увеличился, и не было получено признаков излечения. В конечном счете, у всех больных ММ происходят рецидивы даже при поддерживающей терапии с помощью α-интерферона (IFN-α) одного или в комбинации со стероидами.

Если пациент является кандидатом или возможным кандидатом для аутологической трансплантации, индукционная терапия часто не включает алкилирующие вещества, так как алкилирующие вещества мешают выделению стволовых клеток. Предпочтительным режимом является VAD, что позволяет выделять стволовые клетки (Wu K.L., Clin. Lymphoma Myeloma, 2005, 6:96). Другая возможность, проверенная в условиях индукции перед трансплантацией, включает талидомид в комбинации с дексаметазоном (Cavo M., Blood, 2005, 106:35).

Эффективность доступных химиотерапевтических схем лечения ММ ограничена вследствие низкой скоростью пролиферации клеток и возникновением множественной лекарственной устойчивости. Более чем у 90% больных ММ заболевание становится химиорезистентным. Поэтому ведутся поиски альтернативных схем лечения, имеющих целью адоптивную иммунотерапию, направленную на поверхностные антигены плазмоцитов.

CD38 является примером антигена, экспрессирующегося на таких злокачественных плазмоцитах, который экспрессируется при различных злокачественных гематологических заболеваниях, в том числе при множественной миеломе, хронической В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, острой В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, макроглобулинемии Вальденстрема, первичном системном амилоидозе, мантиевидно-клеточной лимфоме, пролимфоцитарной/миелоцитарной лейкемии, острой миелоидной лейкемии, хронической миелоидной лейкемии, фолликулярной лимфоме, NK-клеточной лейкемии и плазмоцитарной лейкемии. Экспрессия CD38 была описана в эпителиальных/эндотелиальных клетках различного происхождения, включая железистый эпителий в простате, островковые клетки в поджелудочной железе, эпителий протоков в железах, в том числе околоушной железы, эпителиальные клетки бронхов, клетки семенников и яичников и эпителий опухолей при колоректальной аденокарциноме. Заболевания, при которых может быть задействована экспрессия CD38, включают бронхоэпителиальные карциномы легких, рак молочной железы (возникающий при злокачественной пролиферации эпителиальной выстилки протоков и долек молочной железы), опухоли поджелудочной железы, возникающие из β-клеток (инсулиномы), опухоли, возникающие из кишечного эпителия (например, аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома). В ЦНС экспрессируют CD38 нейробластомы. Другие такие заболевания включают карциномы предстательной железы, семиномы яичек и рак яичников.

В норме CD38 экспрессируется гемопоэтическими клетками и в твердых опухолях. В отношении гемопоэтических клеток большинство медуллярных тимоцитов являются клетками $CD38^+$, покоящиеся и циркулирующие Т- и В-клетки - $CD38^-$, а активированные клетки - $CD38^+$. CD38 также экспрессируется примерно у 80% покоящихся NK-клеток и моноцитов, а также на лимфобластах зародышевых центров лимфатических узлов, плазматических В-клетках и некоторых внутрифолликулярных клетках. CD38 также может экспрессироваться дендритными клетками. Значительная часть нормальных клеток костного мозга, в частности клеток-предшественников, экспрессируют CD38. Наряду с лимфоидными клетками-предшественниками, CD38 также экспрессируется на эритроцитах и на тромбоцитах.

В отношении твердых опухолей CD38 экспрессируется в кишечнике внутриэпителиальными клетками и лимфоцитами lamina propria, клетками Пуркинье и нейрофибриллярными клубками в мозге, эпителиальными клетками предстательной железы, β-клетками поджелудочной железы, остеокластами в

костях, клетками сетчатки глаза и сарколеммой гладких и поперечно-полосатых мышц.

Приписываемые CD38 функции включают как опосредование рецепторов в явлениях адгезии и передачи сигналов, так и (экто)энзиматическую активность. В качестве эктофермента CD38 использует NAD^+ в качестве субстрата для образования циклической ADP-рибозы (cADPR) и ADPR, а также никотинамид- и никотинат-аденин-динуклеотидфосфата (NAADP). Было показано, что cADPR и NAADP действуют как вторичные посредники для мобилизации Ca^{2+}. При превращении NAD^+ в cADPR CD38 регулирует внеклеточную концентрацию NAD^+ и тем самым выживаемость клеток путем модулирования NAD-индуцируемой гибели клеток (NCID). Наряду с передачей сигналов через Ca^{2+}, происходит и передача сигналов CD38 через взаимодействие с комплексами рецептор-антиген на Т- и В-клетках или с другими типами рецепторных комплексов, например, молекулами MHC, и таким образом CD38 участвует в ряде клеточных реакций, а также в переключении изотипа и секреции IgG1.

В литературе описаны антитела к CD38, например в Lande R. et al., Cell Immunol. 220(1), 30-8 (2002); Ausiello C.M. et al., Tissue Antigens, 56(6), 539-47 (2000) и Cotner T. et al., Int. J. Immunopharmacol. 3(3), 255-68 (1981); а также в WO 2005/103083 (Morphosys). CD38 обладает целым рядом функций, которые могут или не могут активироваться при связывании молекул с CD38. Например, мышиное антитело IB4 против CD38 обладает свойствами агониста CD38. Показано, что IB4 вызывает активацию Т-клеток, о чем свидетельствует мобилизация Ca^{2+} в клетках Jurkat (Zubiaur M. et al., J. Immunol. 159(1), 193-205 (1997)), индуцирует значительную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), вызывает выделение значительного количества IL-6 и вызывает выделение заметного количества IFN-γ (Lande, Zubiaur Morra, Ansiello, supra).

Очевидно, что, несмотря на последние достижения в открытии и разработке противораковых средств, многие формы рака с участием экспрессирующих CD38 опухолей все еще имеют плохие прогнозы. Таким образом, существует потребность в усовершенствовании способов лечения таких форм рака.

Сущность изобретения

Целью изобретения является получение усовершенствованных способов лечения CD38-экспрессирующих опухолей, которые приведут к повышению эффективности и/или продлению срока жизни.

Так, в первом основном аспекте изобретение касается способа торможения роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ включает введение данному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося с CD38;

ii) по меньшей мере одного кортикостероида;

iii) по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

Эти три типа медикаментов могут вводиться одновременно или поочередно в любом порядке. Более того, они могут вводиться по отдельности или в одной или двух фармацевтических композициях.

Тройная терапия в некоторых воплощениях может позволить вводить меньшее количество медикамента, чем при моно- или двойной терапии. Такое меньшее количество может создавать меньше побочных эффектов, способствуя более эффективному лечению таких пациентов, которых невозможно лечить высокими дозами, как-то пожилых или гиперчувствительных пациентов.

В одном воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело, связывающееся с CD38, представляет собой описанное в нем антитело -005, -003 или -024. Эти антитела уже были описаны ранее в патентной заявке PCT/DK 2006/000166 (WO 2006/099875) (Genmab).

В некоторых воплощениях данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает

алкилирующее вещество, как-то мелфалан; и/или

производное глутаминовой кислоты, как-то талидомид или леналидомид; и/или

ингибитор протеасом, как-то бортезомиб.

В аналогичном аспекте изобретение касается способа лечения рака с участием клеток, экспрессирующих CD38, у индивидуума, при этом способ включает особенности способа, описанного выше.

В следующем аспекте изобретение касается способа лечения рака с участием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ включает введение данному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося с CD38;

ii) необязательно, по меньшей мере одного кортикостероида;и

iii) необязательно, по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства,

с последующей аутологической пересадкой периферических стволовых клеток или костного мозга.

Таким образом, в этом способе антитело к CD38 используется при индукционной терапии, предшествующей аутологической пересадке периферических стволовых клеток или костного мозга. Не придерживаясь какой-либо определенной теории, полагаем, что антитела к CD38 особенно подходят для такой индукционной терапии, так как они не имеют многих нежелательных побочных эффектов, тем самым

поддерживая пациента в хорошем состоянии перед пересадкой.

В следующем аспекте изобретение касается терапевтической комбинации для торможения роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, которая включает:

i) неагонистическое антитело, связывающееся с CD38;

ii) по меньшей мере один кортикостероид;

iii) по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство,

при этом комбинация подходит для раздельного, поочередного и/или одновременного введения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A представлено связывание антител -003, -005 и контрольного антитела того же изотипа HuMab-KLH с трансфицированными CD38 клетками CHO (CHO-CD38) при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 4.

На фиг. 1B представлено связывание антител -024 и HuMab-KLH с трансфицированными CD38 клетками CHO (CHO-CD38) при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 4.

На фиг. 2A представлено связывание антител -003, -005 и HuMab-KLH с клетками Daudi при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 4.

На фиг. 2B представлено связывание антител -024 и HuMab-KLH с клетками Daudi при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 4.

На фиг. 3 представлено связывание антител -003, -005, -024 и HuMab-KLH с клетками множественной миеломы. Экспериментальные условия описаны в примере 4.

На фиг. 4A представлена способность антител -003 и -005 индуцировать лизис клеток Daudi при ADCC по сравнению с антителами ритуксимаб и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5.

На фиг. 4B представлена способность антитела -024 индуцировать лизис клеток Daudi при ADCC по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5.

На фиг. 5A представлена способность антител -003, -005 и -024 индуцировать лизис свежих опухолевых клеток множественной миеломы при ADCC по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5.

На фиг. 5B представлена способность антител -003, -005 и -024 индуцировать лизис свежих опухолевых клеток плазмоцитарной лейкемии при ADCC по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5.

На фиг. 6 представлена способность антител -003 и -005 индуцировать лизис AMO-1 (линии клеток множественной миеломы) при ADCC по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5

На фиг. 7 представлена способность антител -003 и -005 индуцировать лизис AMO-1 (линии клеток множественной миеломы) при ADCC по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 5.

На фиг. 8 представлен опосредованный CDC лизис клеток Daudi-luc, индуцированный антителами -003 и -005, по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 9A представлен опосредованный CDC лизис клеток CHO-CD38, индуцированный антителами -003 и -005, по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 9B представлен опосредованный CDC лизис клеток CHO-CD38, индуцированный антителом -024, по сравнению с HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 10A представлен опосредованный CDC лизис 3% невосприимчивых опухолевых клеток в присутствии антител -003, -005 и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 10B представлен опосредованный CDC лизис 9% невосприимчивых опухолевых клеток в присутствии антител -003, -005 и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 10C представлен опосредованный CDC лизис 30-40% опухолевых клеток в

присутствии антител -003, -005 и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 10D представлен опосредованный CDC лизис 70% опухолевых клеток в присутствии антител -003, -005 и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 10E представлен опосредованный CDC лизис клеток множественной миеломы в присутствии антител -024 и HuMab-KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 6.

На фиг. 11 показано, что антитела -003 и -005 не вызывают перекрестного блокирования связывания CD38. Экспериментальные условия описаны в примере 7.

На фиг. 12A представлено иммуногистологическое окрашивание макрофагов, лимфоцитов и плазматических B-клеток с помощью антитела -003. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 12B представлено иммуногистологическое окрашивание бронхиального эпителия с помощью антитела -003. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 12C представлено иммуногистологическое окрашивание миоцитов с помощью антитела -003. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 12D представлено иммуногистологическое окрашивание лимфоидной ткани макаки с помощью антитела -003. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 13A представлено иммуногистологическое окрашивание макрофагов, лимфоцитов и плазматических B-клеток с помощью антитела -005. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 13B представлено иммуногистологическое окрашивание бронхиального эпителия с помощью антитела -005. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 13C представлено иммуногистологическое окрашивание миоцитов с помощью антитела -005. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 13D представлено иммуногистологическое окрашивание лимфоидной ткани макаки с помощью антитела -005. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 14A представлено иммуногистологическое окрашивание печеночного эндотелия с помощью антитела CD31. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 14B представлено иммуногистологическое окрашивание печеночного эндотелия с помощью антитела vWF. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 14C представлено иммуногистологическое окрашивание печеночного эндотелия с помощью антитела против KLH. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 14D представлено иммунопатологическое окрашивание печеночного эндотелия с помощью антитела -003. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 14E представлено иммунопатологическое окрашивание печеночного эндотелия с помощью антитела -005. Экспериментальные условия описаны в примере 10.

На фиг. 15A представлена перекрестная реактивность антител -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLH на лимфоцитах макаки при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 11.

На фиг. 15B представлена перекрестная реактивность антител -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLH на моноцитах макаки при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 11.

На фиг. 15C представлена перекрестная реактивность антител -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLH на PBMC макаки резус при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 11.

На фиг. 16A представлена интернализация антитела -003 при измерении методом тушения EtBr. Экспериментальные условия описаны в примере 12.

На фиг. 16B представлена интернализация антитела -005 при измерении методом тушения EtBr. Экспериментальные условия описаны в примере 12.

На фиг. 17A представлено ингибирование роста опухолевых клеток антителами -003 и -005 по сравнению с моноклональным антителом к CD20 (ритуксимаб) и HuMab-KLH в профилактических условиях при измерении методом интраскопии мышей SCID на люциферазу in vivo. Экспериментальные условия описаны в примере 13.

На фиг. 17B представлено ингибирование роста опухолевых клеток антителами -003 и -005 по сравнению с моноклональным антителом к CD20 (ритуксимаб) и HuMab-KLH в терапевтических условиях I при измерении методом интраскопии мышей SCID на люциферазу in vivo. Экспериментальные условия описаны в примере 13.

На фиг. 17C представлено ингибирование роста опухолевых клеток антителами -003 и -005 по сравнению с моноклональным антителом к CD20 (ритуксимаб) и HuMab-KLH в терапевтических условиях II при измерении методом интраскопии мышей SCID на люциферазу in vivo. Экспериментальные условия описаны в примере 13.

На фиг. 17D представлено ингибирование роста опухолевых клеток антителами -003 и -024 по сравнению с HuMab-KLH в терапевтических условиях III при измерении методом интраскопии мышей SCID на люциферазу in vivo. Экспериментальные условия описаны в примере 13.

На фиг. 18 представлено индуцирование апоптоза антителами -003 и -005 по сравнению с моноклональным антителом к CD20 (ритуксимаб) и HuMab-KLH без или с поперечным сшиванием. Экспериментальные условия описаны в примере 14.

На фиг. 19 представлена гистологическая оценка CD38-положительных клеток в имплантированных мышам RA-SCID ксенотрансплантатах на 14 день после обработки антителом против KLH (HuMab-KLH) или -005. Методы описаны в примере 15.

На фиг. 20 представлена гистологическая оценка CD138-положительных клеток в имплантированных мышам RA-SCID ксенотрансплантатах на 14 день после обработки антителом против KLH (HuMab-KLH) или -005. Методы описаны в примере 15.

На фиг. 21 представлено окрашивание B-клеток на CD38 в ксенотрансплантатах перед имплантированием (A) либо после обработки антителом против KLH (B) или -005 (C). Методы описаны в примере 15.

На фиг. 22 представлено окрашивание B-клеток на CD138 в ксенотрансплантатах перед имплантированием (A) либо после обработки антителом против KLH (B) или -005 (C). Методы описаны в

примере 15.

На фиг. 23 представлено связывание антител -003 и -005 с CD38 дикого типа и мутантным CD38 человека при измерении методом ELISA. 23A: связывание антител -003 и -005 с мутантным по T237A CD38 человека. 23B: связывание антител -003 и -005 с мутантным по Q272R CD38 человека. 23C: связывание антител -003 и -005 с мутантным по S274F CD38 человека. Методы описаны в примере 17.

На фиг. 24 представлен эффект антител -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLH на пролиферацию (A), продукцию IL-6 (B) и продукцию IFN-γ (C) в PBMCs человека. Методы описаны в примерах 18, 19 и 20 соответственно.

На фиг. 25 представлена энзиматическая продукция cGDP-рибозы в присутствии различных концентраций антител -003 (B), -005 (C), -024 (D) или анти-KLH (A). Методы описаны в примере 23.

На фиг. 26 представлено сравнение между антителами -003, -005 и антителом TH-3079 фирмы Morphosys на CDC в клетках CHO-CD38 (A), CDC в клетках Daudi (B) и на ADCC в клетках Daudi (C). Методы описаны в примере 24.

На фиг. 27 представлено связывание антитела -005 и контрольного антитела того же изотипа HuMab-KLH с трансформированными EBV B-клетками шимпанзе при измерении методом проточной цитометрии. Экспериментальные условия описаны в примере 26.

На фиг. 28 представлена способность антитела -005 одного и в комбинации с другими соединениями (дексаметазон (Dex) и бортезомиб (Bor)) индуцировать гибель клеток в клеточной линии множественной миеломы UM6 in vitro.

В перечне последовательностей по изобретению представлены:

SEQ ID NO: 1 - нуклеотидная последовательность области V_L антитела -003;

SEQ ID NO: 2 - аминокислотная последовательность области V_L антитела -003;

SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_L антитела -003, включающая аминокислоты 24-34 из SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 4 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_L антитела -003, включающая аминокислоты 50-56 из SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 5 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_L антитела -003, включающая аминокислоты 89-97 из SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 6 - нуклеотидная последовательность области V_H антитела -003;

SEQ ID NO: 7 - аминокислотная последовательность области V_H антитела -003;

SEQ ID NO: 8 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_H антитела -003, включающая аминокислоты 31-35 из SEQ ID NO: 7;

SEQ ID NO: 9 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_H антитела -003, включающая аминокислоты 50-66 из SEQ ID NO: 7;

SEQ ID NO: 10 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_H антитела -003, включающая аминокислоты 99-109 из SEQ ID NO: 7;

SEQ ID NO: 11 - нуклеотидная последовательность области V_L антитела -005;

SEQ ID NO: 12 - аминокислотная последовательность области V_L антитела -005;

SEQ ID NO: 13 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_L антитела -005, включающая аминокислоты 24-34 из SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 14 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_L антитела -005, включающая аминокислоты 50-56 из SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 15 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_L антитела -005, включающая аминокислоты 89-97 из SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 16 - нуклеотидная последовательность области V_H антитела -005;

SEQ ID NO: 17 - аминокислотная последовательность области V_H антитела -005;

SEQ ID NO: 18 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_H антитела -005, включающая аминокислоты 31-35 из SEQ ID NO: 17;

SEQ ID NO: 19 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_H антитела -005, включающая аминокислоты 50-66 из SEQ ID NO: 17;

SEQ ID NO: 20 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_H антитела -005, включающая аминокислоты 99-111 из SEQ ID NO: 17;

SEQ ID NO: 21 - нуклеотидная последовательность области V_L антитела -024;

SEQ ID NO: 22 - аминокислотная последовательность области V_L антитела -024;

SEQ ID NO: 23 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_L антитела -024, включающая аминокислоты 24-34 из SEQ ID NO: 22;

SEQ ID NO: 24 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_L антитела -024, включающая аминокислоты 50-56 из SEQ ID NO: 22;

SEQ ID NO: 25 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_L антитела -024, включающая аминокислоты 89-97 из SEQ ID NO: 22;

SEQ ID NO: 26 - нуклеотидная последовательность области V_H антитела -024;

SEQ ID NO: 27 - аминокислотная последовательность области V_H антитела -024;

SEQ ID NO: 28 - аминокислотная последовательность участка CDR1 области V_H антитела -024, включающая аминокислоты 31-35 из SEQ ID NO: 27;

SEQ ID NO: 29 - аминокислотная последовательность участка CDR2 области V_H антитела -024, включающая аминокислоты 50-66 из SEQ ID NO: 27;

SEQ ID NO: 30 - аминокислотная последовательность участка CDR3 области V_H антитела -024, включающая аминокислоты 99-111 из SEQ ID NO: 27;

SEQ ID NO: 31 - последовательность CD38 человека;

SEQ ID NO: 32 - последовательность мутантного CD38 человека, у которого остаток треонина в положении 237 заменен остатком аланина;

SEQ ID NO: 33 - последовательность мутантного CD38 человека, у которого остаток глутамина в положении 272 заменен остатком аргинина;

SEQ ID NO: 34 - последовательность мутантного CD38 человека, у которого остаток серина в положении 274 заменен остатком фенилаланина.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Определения

"Неагонистическое антитело, которое связывается с CD38" или "антитело к CD38" в настоящем изобретении означает такое антитело, которое при связывании с CD38 не вызывает значительной пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови в сравнении с пролиферацией, вызванной контрольным антителом того же изотипа или одной лишь средой (при определении, например, как описано ниже в примере 18). В одном воплощении используемое в изобретении антитело к CD38 не только не является агонистом, но даже является антагонистом CD38.

Термины "CD38" и "антиген CD38" в настоящем изобретении применяются взаимозаменяемым образом и охватывают любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD38 человека, которые экспрессируются клетками в природе или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном CD38. Синонимами CD38, признанными в данной области, являются ADP-рибозилциклаза 1, cADPr-гидролаза 1, Cd38-rs1, гидролаза циклической ADP-рибозы 1, I-19, антиген NIM-R5.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу близких по структуре гликопротеидов, состоящих из двух пар полипетидных цепей: одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре соединены друг с другом дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. См., к примеру, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена C_L. Области V_H и V_L можно еще подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно заданные петли), также именуемые участками комплементарности (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, именуемыми каркасными участками (FR).

Каждый V_H и V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Как правило, нумерация аминокислотных остатков в этой области проводится по методу, описанному в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (такие выражения, как нумерация остатков вариабельного домена по Кабату относятся к этой системе нумерации для вариабельных доменов тяжелой цепи или легкой цепи). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению участка FR или CDR вариабельного домена или же добавлению в него. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать вставку единственной аминокислоты (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 участка CDR2 V_H и нескольких остатков (к примеру, остатков 82a, 82b, 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 участка FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кабату для данного антитела можно установить путем совмещения последовательности антитела по участкам гомологичности со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Кабату.

Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения обозначает молекулу иммуноглобулина, фрагмент молекулы иммуноглобулина или производное одного из них, которое обладает способностью к специфическому связыванию с антигеном при обычных физиологических условиях в течение значительного периода времени, к примеру по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 45 мин, по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, 24 ч или больше, 48 ч или больше, 3, 4, 5, 6, 7 или больше дней и т.д., или любого иного существенного и функционально определенного промежутка времени (например, времени, достаточного для индуцирования, стимулирования, усиления и/или модулирования физиологической реакции, связанной со связыва-

нием антитела с антигеном).

Вариабельные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Антитело к CD38 может представлять собой биспецифическое антитело, диатело или подобную молекулу (к примеру, см. описание диател в PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)). В самом деле, биспецифические антитела, диатела и т.п., предусмотренные настоящим изобретением, могут связываться с любой подходящей мишенью, а также с отдельной частью CD38.

Как указано выше, термин антитело, если не указано иначе или явно не противоречит контексту, охватывает фрагменты антител, сохраняющие способность к специфическому связыванию антигена. Было показано, что функция связывания антигена антителом может выполняться фрагментами полного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антитело", включают:

(i) Fab-фрагменты, т.е. одновалентные фрагменты, состоящие из доменов V_L, V_H, C_L и C_H1;

(ii) $F(ab)_2$- и $F(ab')_2$-фрагменты, т.е. двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком на шарнирном участке;

(iii) Fd-фрагменты, состоящие в основном из доменов V_H и C_H1;

(iv) Fv-фрагменты, состоящие в основном из доменов V_L и V_H одного плеча антитела;

(v) dAb-фрагменты (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), состоящие в основном из домена V_H;

(vi) отдельные участки комплементарности (CDR);

(vii) комбинации из двух или нескольких отдельных участков CDR, которые необязательно могут соединяться синтетическим линкером.

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных методов синтетическим линкером, позволяющим получать их в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединяются парами с образованием одновалентных молекул, известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), например, см. Bird et al., Science, 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином "антитело", если не оговорено иначе или не диктуется четко контекстом. Термин "антитело" охватывает и другие формы одноцепочечных антител, как-то диатела. Хотя такие фрагменты в общем охватываются значением термина "антитело", они собирательно и независимо друг от друга составляют уникальные особенности настоящего изобретения, проявляя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные в контексте настоящего изобретения фрагменты антител дополнительно обсуждаются далее.

Следует также иметь в виду, что термин "антитело" в общем охватывает и поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), такие антителоподобные полипептиды, как химерные антитела и гуманизированные антитела, антиидиотипические (анти-Id) антитела к антителам и фрагменты антител, сохраняющие способность к специфическому связыванию антигена (антигенсвязывающие фрагменты), полученные любым известным методом, как-то энзиматическим расщеплением, синтезом пептидов и рекомбинантными методами. Созданное антитело может обладать любым изотипом.

Термин "эпитоп" обозначает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок таких молекул, как аминокислоты или боковые цепи сахаров и обычно обладают специфическими характеристиками трехмерной структуры, а также специфическими характеристиками заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми исчезает в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (которые также именуются иммунодоминантной компонентой эпитопа), и другие аминокислотные остатки, не принимающие непосредственного участия в связывании, как-то аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом (иными словами, эти аминокислотные остатки находятся на месте посадки специфического антигенсвязывающего пептида).

Термин "биспецифичная молекула" служит для обозначения любого вещества, как-то белка, пептида либо белкового или пептидного комплекса, обладающего двумя разными специфичностями связывания. Например, молекула может связываться или взаимодействовать с (a) поверхностным антигеном клетки и (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки. Термин "мультиспецифичная молекула" служит для обозначения любого вещества, к примеру белка, пептида либо белкового или пептидного комплекса, обладающего более чем двумя разными специфичностями связывания. Например, молекула может связываться или взаимодействовать с (a) поверхностным антигеном клетки, (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки и (c) по меньшей мере одним другим компонентом. Соответственно, настоящее изобретение охватывает биспецифичные, триспецифичные, тетраспецифичные и другие мультиспе-цифичные молекулы, направленные против CD38 и против других поверхностных антигенов клетки или таких мишеней, как Fc-рецепторы на эффекторных клетках.

Термин "биспецифичные антитела" служит для обозначения любых антител к CD38, представляющих собой биспецифичные молекулы. Термин "биспецифичные антитела" также охватывает диатела. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифичные антитела, у которых домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи при помощи такого линкера, который будет слишком коротким для спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, тем самым вынуждая домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих центра (например, см. Holliger P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993); Poljak R.J. et al., Structure, 2, 1121-1123 (1994)).

В настоящем изобретении термин "эффекторная клетка" относится к таким иммунным клеткам, которые участвуют в эффекторной фазе иммунного ответа, в противоположность распознавательной и активационной фазам иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоциты (например, В-клетки и Т-клетки, в том числе цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, нормальные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, полиморфно-ядерные клетки, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют определенные Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых воплощениях эффекторные клетки способны индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), к примеру нейтрофилы способны индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, экспрессирующие FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток-мишеней и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы либо в связывании клеток, презентирующих антигены. В некоторых воплощениях эффекторные клетки могут подвергать фагоцитозу антиген мишени, клетки мишени или микроорганизмы. Экспрессия определенного FcR на эффекторных клетках может регулироваться такими гуморальными факторами, как цитокины. Например, оказалось, что экспрессия FcγRI усиливается под действием γ-интерферона (IFN-γ) и/или G-CSF. Такое усиление экспрессии повышает цитотоксическую активность несущих FcγRI клеток против мишеней. Эффекторные клетки могут подвергать фагоцитозу или лизировать антиген мишени или клетки мишени.

Термин "человеческое антитело" в настоящем изобретении служит для обозначения таких антител, у которых вариабельные и константные области происходят из последовательностей естественных иммуноглобулинов человека. Человеческие антитела настоящего изобретения могут включать аминокислотные остатки, которые не входят в последовательности естественных иммуноглобулинов человека (к примеру, мутации, введенные при случайном или направленном мутагенезе in vitro или при соматических мутациях in vivo). Однако термин "человеческое антитело" в настоящем изобретении не охватывает такие антитела, у которых в каркасную последовательность человека встроены последовательности CDR естественного антитела из другого вида млекопитающих, к примеру мыши.

В настоящем изобретении человеческое антитело "происходит из" определенной естественной последовательности, если антитело получено из какой-либо системы с использованием последовательностей иммуноглобулинов человека, например при иммунизации трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулинов человека, или при скрининге библиотеки генов иммуноглобулинов человека, и при этом аминокислотная последовательность выбранного человеческого антитела по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95%, к примеру по меньшей мере на 96%, как-то по меньшей мере на 97%, к примеру по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой сегментом естественного гена вариабельной области V_H или V_L. Как правило, человеческое антитело, происходящее из определенной последовательности сегмента естественного гена вариабельной области V_H или V_L, должно проявлять не более 10 аминокислотных отличий, как-то не более 5, к примеру не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного отличия от аминокислотной последовательности, кодируемой естественным геном иммуноглобулина.

"Химерное" антитело - это антитело, содержащее один или несколько участков из одного антитела и один или несколько участков из одного или нескольких других антител, происходящих их другого вида. Одновалентное химерное антитело представляет собой димер (HL), состоящий из химерной H-цепи, связанной дисульфидными мостиками с химерной L-цепью. Двухвалентное химерное антитело представляет собой тетрамер (H_2L_2), состоящий из двух HL-димеров, соединенных по меньшей мере одним дисульфидным мостиком. Можно получить и поливалентное химерное антитело, к примеру, используя CH-участок, который подвергается олигомеризации (например, из H-цепи IgM или μ-цепи). Как правило, химерное антитело означает такое антитело, у которого часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если только они проявляют требуемую биологическую активность (например, см. US 4,816,567 и Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855 (1984)). Химерные антитела получают рекомбинантными способами, хорошо известными в этой области (к примеру, см. Cabilly et al., PNAS USA, 81, 3273-3277 (1984); Morrison et al., PNAS USA, 81, 6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature, 312, 643-646 (1984); EP 125023; Neuberger et al., Nature, 314,

268-270 (1985); EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; EP 184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066-1074 (1986); WO 87/02671; Liu et al., PNAS USA, 84, 3439-3443 (1987); Sun et al., PNAS USA, 84, 214-218 (1987); Better et al., Science, 240, 1041-1043 (1988); и Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)).

"Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, происходящее из другого вида, чем человек, но в котором некоторые аминокислоты в каркасном и константном доменах тяжелой и легкой цепей были подвергнуты мутации с тем, чтобы избежать или устранить иммунный ответ у человека. Гуманизированные формы не принадлежащих человеку (к примеру, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитела-реципиента), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области другого вида (антитела-донора), как-то мыши, крысы, кролики или другие приматы, обладающие такими желательными характеристиками связывания, как специфичность и аффинность. В некоторых случаях остатки Fv каркасного участка (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими чужими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются в антителах реципиента или антителах донора. Такие модификации делаются для того, чтобы еще больше оптимизировать рабочие показатели антител. В общем, гуманизированное антитело должно содержать практически весь по меньшей мере один или чаще два вариабельных домена, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям чужого иммуноглобулина, а все или практически все каркасные участки (FR) представляют собой последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Более подробно об этом см. Jones et al., Nature, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332, 323-329 (1988) и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992).

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в настоящем изобретении относятся к препаратам молекул антител однородного молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, у которых вариабельные и константные области происходят из последовательностей естественного иммуноглобулина человека. Моноклональные антитела человека могут быть получены методом гибридомы, который включает получение В-клеток из трансгенного или трансхромосомного животного, как-то трансгенной мыши, у которой геном содержит трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, и слияние их с "бессмертными" клетками. Моноклональное антитело сокращенно обозначается как mAb.

В настоящем изобретении "специфическое связывание" относится к связыванию антител с заданным антигеном. Как правило, антитело связывается со сродством, соответствующим значению K_D в 10^{-7} М или меньше, как-то 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, 10^{-10} М или меньше или 10^{-11} М или даже меньше, при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000, используя рекомбинантный CD38 в качестве лиганда и антитело в качестве определяемого вещества. Антитело может связываться с заданным антигеном со сродством, соответствующим значению K_D по меньшей мере в 10 раз меньше, как-то по меньшей мере в 100 раз меньше, к примеру по меньшей мере в 1000 раз меньше, как-то по меньшей мере в 10000 раз меньше, к примеру по меньшей мере в 100000 раз меньше, чем при связывании с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), другим, чем заданный антиген или близкородственные антигены. В какой степени сродство будет выше, зависит от значения K_D антитела, так что при очень низких значениях K_D (т.е. при высокой специфичности антитела) сродство к антигену будет по меньшей мере в 10000 раз выше, чем к неспецифическому антигену.

Термин "специфичность" в настоящем изобретении обозначает способность CD38-связывающих пептидов, как-то антител к CD38, к распознаванию эпитопа на CD38, в то же время не обладая или почти не обладая заметной реактивностью к другим частям CD38 (включая другие эпитопы, связывающиеся с другими антителами к CD38). Специфичность можно определить в относительных единицах методом конкурентного связывания, как описано в настоящем изобретении. В частности, специфичность можно определить любым из методов идентификации характеристик эпитопа, описанных в настоящем изобретении, либо их эквивалентов, известных в этой области.

Антитело, специфичное к определенной антигенной детерминанте, тем не менее может проявлять перекрестную реактивность к другим биомолекулам, которые могут находиться в каком-то биологическом окружении вместе с CD38. Более конкретно, антитело к CD38 может давать перекрестную реакцию с гомологами CD38 из других видов. Так или иначе, такие перекрестно-реактивные антитела обычно избирательны к CD38 человека в отношении соответствующей структуры и/или факторов окружающей среды.

Термин "избирательность" в настоящем изобретении означает предпочтительное связывание антитела к CD38 с определенным участком, мишенью или пептидом; как правило, участком или эпитопом на

CD38, в противоположность одной или нескольким другим биологическим молекулам, структурам, клеткам, тканям и т.д. В одном воплощении используемое в настоящем изобретении антитело к CD38 избирательно к какой-то части CD38 в контексте раковых клеток толстой кишки (т.е. антитело к CD38 избирательно связывается с этой частью CD38 помимо других компонентов раковых клеток толстой кишки).

Термин "k_d" (c^{-1}) в настоящем изобретении служит для обозначения равновесной константы скорости диссоциации для определенного взаимодействия антитело-антиген. Данная величина также обозначается как k_{off}.

Термин "k_a" ($M^{-1}\times c^{-1}$) в настоящем изобретении служит для обозначения равновесной константы скорости ассоциации для определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "K_D" (M) в настоящем изобретении служит для обозначения равновесной константы диссоциации для определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "K_A" (M^{-1}) в настоящем изобретении служит для обозначения равновесной константы ассоциации для определенного взаимодействия антитело-антиген и выводится путем деления k_a на k_d.

В настоящем изобретении "изотип" означает класс антитела (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

"Клетки-мишени" должны означать любые нежелательные клетки у индивидуума. В некоторых воплощениях клетки-мишени представляют собой клетки, экспрессирующие или суперэкспрессирующие CD38. К клеткам, экспрессирующим CD38, как правило, относятся гемопоэтические клетки, как-то медуллярные тимоциты, активированные Т- и В-клетки, 80% покоящихся NK-клеток и моноцитов, лимфобласты зародышевых центров лимфатических узлов, плазматические В-клетки и некоторые внутрифолликулярные клетки, дендритные клетки, нормальные клетки костного мозга, определенные клетки-предшественники, 50-80% клеток крови пуповины, эритроцитов и тромбоцитов. CD38 также может экспрессироваться негемопоэтическими клетками, как-то интраэпителиальными клетками и лимфоцитами lamina propria в кишечнике, клетками Пуркинье и нейрофибриллярными клубками в мозге, эпителиальными клетками предстательной железы, β-клетками поджелудочной железы, остеокластами в костях, клетками сетчатки глаза и сарколеммой гладких и поперечно-полосатых мышц. На злокачественных клетках CD38 экспрессируется при различных злокачественных гематологических заболеваниях, в том числе при множественной миеломе, первичной или вторичной плазмоцитарной лейкемии, хронической В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, острой В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, макроглобулинемии Вальденстрема, первичном системном амилоидозе, мантиевидно-клеточной лимфоме, пролимфоцитарной/миелоцитарной лейкемии, острой миелоидной лейкемии, хронической миелоидной лейкемии, фолликулярной лимфоме и NK-клеточной лейкемии.

В настоящем изобретении термин "индивидуум" охватывает как человека, так и животных. Термин "животные" охватывает всех позвоночных, как млекопитающих, так и не млекопитающих, как-то приматов, овец, собак, коров, кур, амфибий, рептилий и т.п.

"Лечение" означает введение эффективного количества терапевтически активного соединения по настоящему изобретению с целью облегчения, улучшения или устранения (излечения) симптомов или заболеваний.

Аспекты и воплощения изобретения

В первом основном аспекте изобретение касается способа торможения роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ включает введение данному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося, а именно специфически связывающегося, с CD38;

ii) по меньшей мере одного кортикостероида и

iii) по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

В следующем основном аспекте изобретение касается способа лечения рака с участием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ включает введение данному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося, а именно специфически связывающегося, с CD38;

ii) необязательно, по меньшей мере одного кортикостероида и

iii) необязательно, по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства, как то неалкилирующего некортикостероидного химиотерапевтического средства,

с последующей аутологической пересадкой периферических стволовых клеток или костного мозга.

В одном воплощении вышеприведенных способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает цитотоксическое средство и/или ингибитор ангиогенеза. В другом воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает алкилирующее вещество.

В следующем воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из мелфалана, мехлорэтамина, тиоэпа, хлорамбуцила, кармустина (BSNU), ломустина (CCNU), циклофосфамида, бусульфана, дибромманнитола, стрептозотоцина, дакарбазина (DTIC), прокарбазина, митомицина С, цис-

платина и других производных платины, как-то карбоплатина.

В следующем воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, как-то талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например, CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC4047 (Actimid™).

В следующем воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает ингибитор протеасом, как-то бортезомиб (Velcade®), или такой алкалоид барвинка, как винкристин, или такой антрациклин, как доксорубицин.

В одном воплощении способов изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает глюкокортикоид. В другом воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон или дексаметазон.

В следующих воплощениях изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан.

В следующих воплощениях изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид.

В следующих воплощениях изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан и талидомид.

В следующих воплощениях изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид и/или леналидомид.

В следующих воплощениях изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает винкристин и/или доксорубицин.

В одном воплощении способов изобретения данное неагонистическое антитело, которое связывается с CD38, является моноклональным антителом, как-то моноклональным антителом человека.

В другом воплощении изобретения данное антитело является антагонистом CD38.

В следующем воплощении изобретения данное антитело представляет собой

антитело, которое не вызывает высвобождения значительного количества IL-6 из моноцитов человека или мононуклеарных клеток периферической крови при определении способом, описанным в примере 19 описания; и/или

антитело, которое не вызывает высвобождения заметного количества IFN-γ из Т-клеток человека или мононуклеарных клеток периферической крови при определении способом, описанным в примере 20 описания; и/или

антитело, которое интернализируется клетками, экспрессирующими CD38, к примеру интернализируется клетками CHO-CD38 в течение 5-15 мин при 37°C по методике, описанной в примере 12 описания; и/или

антитело, которое вызывает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), к примеру, со значением EC_{50} менее 15 нг/мл, как-то менее 10 нг/мл в клетках Daudi-luc, и со значением EC_{50} менее 75 нг/мл, как-то менее 50, 30 или 10 нг/мл в клетках MM при определении способом, описанным в примере 5 описания, и/или

антитело, которое вызывает комплементзависимую цитотоксичность (CDC) в присутствии комплемента, к примеру, со значением EC_{50} менее 5 мкг/мл, как-то менее 1 мкг/мл в клетках Daudi-luc или CD38-CHO по методике, описанной в примере 6 описания; и/или

антитело, которое ингибирует синтез cGDPR; и/или

антитело, которое ингибирует синтез cADPR; и/или

антитело, которое связывается с CD38 человека со значением K_D менее 10^{-8} M, как-то в интервале от 10^{-8} до 10^{-11} M, например, в интервале от 7×10^{-9} до 10^{-10} M при определении методом поверхностного плазмонного резонанса, описанным в примере 20 описания; и/или

антитело, которое ингибирует синтез cGDPR по меньшей мере на 25%, как-то по меньшей мере на 30% через 90 мин при концентрации в 3 мкг/мл при определении спектрофотометрическим методом, описанным в примере 24 описания; и/или

антитело, которое ингибирует синтез cADPR по меньшей мере на 25%, как-то по меньшей мере на 30% через 90 мин при концентрации в 3 мкг/мл при определении методом ВЭЖХ, описанным в Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

В одном воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело -003. Антитело -003 является моноклональным антителом человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7.

В другом воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело -005. Антитело -005 является моноклональным антителом человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17.

В следующем воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело -024. Антитело -024 является моноклональным антителом человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В одном воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело, связывающееся с CD38 человека, которое кодируется нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности своих вариабельных областей, приведенные в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

В одном воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело, связывающееся с CD38 человека, которое кодируется нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности своих вариабельных областей, приведенные в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 16 соответственно.

В одном воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело, связывающееся с CD38 человека, которое кодируется нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности своих вариабельных областей, приведенные в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

В следующем воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой одно из антител, описанных в WO 2005/103083 (Morphosys), в частности антитело, содержащее одну или несколько последовательностей, приведенных на фиг. 1b и/или приведенных на фиг. 2B в WO 2005/103083.

Антитела взаимодействуют с антигенами мишени главным образом через аминокислотные остатки, располагающиеся в 6 участках комплементарности (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности внутри CDR отличаются большим разнообразием между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, то можно экспрессировать рекомбинантные антитела, воспроизводящие свойства конкретных природных антител, путем конструирования экспрессионных векторов, включающих последовательности CDR из конкретного природного антитела, пересаженные в каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (например, см. Riechmann L. et al., Nature, 332, 323-327 (1998); Jones P. et al., Nature, 321, 522-525 (1986) и Queen C. et al., PNAS USA, 86, 10029-10033 (1989)).

Поскольку хорошо известно, что домены CDR3 тяжелой цепи антител играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном (Ditzel H.J. et al., J. Immunol. 157(2), 739-49 (1996); Barbas S.M. et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 2161-2162 (1994) и Barbas S.M. et al., Proc. Natl. Acad Sci USA, 92(7), 2529-33 (1995)), то используемые в изобретении антитела могут содержать CDR3 тяжелой цепи антитела -003, или -005, или -024. Используемые в изобретении антитела также могут содержать CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела -003, или -005, или -024.

Итак, в следующем воплощении способов изобретения данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, или антитело, которое конкурирует за связывание к CD38 с данным антителом, например связываясь с тем же эпитопом, что и данное антитело.

В одном воплощении конкуренция определяется методом ELISA, как описано в разделе "Примеры".

В другом воплощении конкуренция определяется методом FACS, как описано в разделе "Примеры".

В другом воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 3, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 4, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 9, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 2, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 7, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, или область V_H, содержащую 1-5, как-то 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20, или антитело, которое конкурирует за связывание к CD38 с данным антителом, например связываясь с тем же эпитопом, что и данное антитело.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 14, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 19, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 12, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 17, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, или область V_H, содержащую 1-5, как-то 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 17.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30, или антитело, которое конкурирует за связывание к CD38 с данным антителом, например, связываясь с тем же эпитопом, что и данное антитело.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 25, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 23, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 25, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 28, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 29, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 22, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22.

В следующем воплощении данное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 27, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, или область V_H, содержащую 1-5, как-то 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 27.

В одном воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из мелфалана, мехлорэтамина, тиоэпа, хлорамбуцила, кармустина (BSNU), ломустина (CCNU), циклофосфамида, бусульфана, дибромманнитола, стрептозотоцина, дакарбазина (DTIC), прокарбазина, митомицина С, цисплатина и других производных платины, как-то карбоплатина, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В одном воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В другом воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, как-то талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например, CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC-4047 (Actimid™), а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, как-то талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC4047 (Actimid™), а данное антитело представляет собой моноклональное антитело человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17.

В другом воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой ингибитор протеасом, как бортезомиб (Velcade®), а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой ингибитор протеасом, как бортезомиб (Velcade®), а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В другом воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой алкалоид барвинка, как винкристин, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой антрациклин, как доксорубицин, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательно-

сти SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В другом воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает глюкокортикоид, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мефалан, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мефалан и талидомид, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В другом воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид и/или леналидомид, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательно-

сти SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 27.

В следующем воплощении данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает винкристин и/или доксорубицин, а данное антитело выбрано из группы, состоящей из

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 7;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID NO: 17;

моноклонального антитела человека типа IgG1, у которого область V_L состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, а область V_H состоит из последовательности SEQ ID No: 27.

Антитела, подходящие для настоящего изобретения, также охватывают варианты антител из примеров. Функциональный вариант области V_L, V_H или участка CDR в отношении антитела к CD38 позволяет ему сохранить по крайней мере существенную часть (по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95% или больше) аффинности/авидности и/или специфичности/избирательности исходного антитела, а в некоторых случаях такое антитело может обладать большей аффинностью, избирательностью и/или специфичностью, чем исходное антитело.

"Вариант" антитела к CD38 представляет собой антитело, отличающееся от исходного антитела (обычно получаемого при иммунизации) изменением одного или нескольких подходящих аминокислотных остатков, а именно заменой, делецией, вставкой или добавлением концевой последовательности в участки CDR или другие последовательности V_H и/или V_L (при условии, что при этом, по крайней мере, сохранится, если даже не улучшится, существенная часть эпитопосвязывающих характеристик исходного антитела).

Так, например, у варианта антитела один или несколько аминокислотных остатков могут быть введены или вставлены в или рядом с одним или несколькими гипервариабельными участками исходного антитела, к примеру в один или несколько участков CDR. Вариант антитела к CD38 может содержать любое число вставок аминокислотных остатков, опять же при условии, что, по крайней мере, сохранится существенная часть эпитопосвязывающих характеристик исходного антитела. Вариант антитела к CD38 по настоящему изобретению может содержать, к примеру, 1-30 вставок аминокислотных остатков, например 1-10, как-то, к примеру, 2-10, например 2-5 или, к примеру, 1-5 вставок аминокислотных остатков. Аналогичным образом, вариант антитела к CD38 по настоящему изобретению может содержать, к примеру, 1-30 делеций аминокислотных остатков, например 1-10, как-то, к примеру, 2-10, например 2-5 или, к примеру, 1-5 делеций аминокислотных остатков. Аналогичным образом, вариант антитела к CD38 по настоящему изобретению может содержать, к примеру, 1-30 замен аминокислотных остатков, например 1-10, как-то, к примеру, 2-10, например 2-5 или, к примеру, 1-5 замен аминокислотных остатков. Аналогичным образом, вариант антитела к CD38 по настоящему изобретению может содержать, к примеру, 1-30 добавлений концевых аминокислотных остатков, например 1-10, как-то, к примеру, 2-10, например 2-5 или, к примеру, 1-5 добавлений концевых аминокислотных остатков. Вариант антитела по настоящему изобретению также может содержать любые комбинации из двух и больше таких вставок, делеций, замен и добавлений концевых аминокислотных остатков при условии, что у варианта, по крайней мере, сохранится существенная часть аффинности, специфичности и/или избирательности исходного антитела в отношении одного или нескольких эпитопов CD38.

В одном воплощении используемое в изобретении антитело включает вариант участка CDR3 из V_H, состоящий в основном из последовательности, которая по меньшей мере на 80%, как-то по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, как-то по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности по любому из SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 20, или SEQ ID NO: 30, причем антитело, по крайней мере, сохраняет существенную часть (по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95% или больше) эпитопосвязывающих характеристик антитела, у которого вариант участка CDR3 из V_H имеет последовательность SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 20, или SEQ ID NO: 30 соответственно, как-то антитела с последовательностью V_H по SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 27 соответственно, как-то антитела с последовательностью V_H по SEQ ID NO: 7 и последовательностью V_L по SEQ ID NO: 2, либо антитела с последовательностью V_H по SEQ ID NO: 17 и последовательностью V_L по SEQ ID NO: 12, либо антитела с последовательностью V_H по SEQ ID NO: 27 и последовательностью V_L по SEQ ID NO: 22 соответственно.

Степень идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа идентичных позиций между этими последовательностями (т.е. % гомологичности = число идентичных позиций/общее число позиций × 100) с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, которые нужно ввести для оптимального совмещения двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение степени идентичности между двумя последовательностями может осуществляться с помощью математического алгоритма, как описано ниже в неограничивающих примерах.

Степень идентичности между двумя последовательностями нуклеотидов можно определить с помощью программы GAP в комплекте программ GCG (доступны на сайте http://www.gcg.com). используя матрицу NWSgapdna.CMP и весовое значение пробела 40, 50, 60, 70 или 80 и весовое значение длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Степень идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить и с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весовых значений PAM120, штраф за длину пробела = 12 и штраф за пробел = 4. Кроме того, степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить и с помощью алгоритма Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)), который встроен в программу GAP в комплекте программ GCG (доступны на сайте http://www.gcg.com), используя матрицу Blossum 62 либо матрицу PAM250 и весовое значение пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и весовое значение длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательность CDR-вариантов может отличаться от последовательности CDR исходного антитела главным образом консервативными заменами, например, по меньшей мере 35, 50% или больше, 60% или больше, 70% или больше, 75% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше (например, 65-99%) замен у варианта представляют собой консервативные замены аминокислотных остатков. В контексте настоящего изобретения консервативные замены можно определить как замены в пределах классов аминокислот, приведенных в одной или нескольких из следующих трех таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp, Glu
Основные остатки	Lys, Arg, His
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser, Thr, Asn, Gln
Алифатические незаряженные остатки	Gly, Ala, Val, Leu, Ile
Неполярные незаряженные остатки	Cys, Met, Pro
Ароматические остатки	Phe, Tyr, Trp

Альтернативные классы аминокислотных остатков для консервативных замен

1	Ala (A)	Ser (S)	Thr (T)
2	Asp (D)	Glu (E)	
3	Asp (N)	Gln (Q)	
4	Arg (R)	Lys (K)	
5	Ile (I)	Leu (L)	Met (M)
6	Phe (F)	Tyr (Y)	Trp (W)

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S, T
Алифатические остатки	I, L, V, M
Циклоалкенильные остатки	F, H, W, Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, Y
Отрицательно заряженные остатки	D, E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, T
Положительно заряженные остатки	H, K, R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T, V
Очень маленькие остатки	A, G, S
Остатки, участвующие в образовании изгибов	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E, R

Другие способы группировки для консервативных замен включают валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Дополнительные группы аминокислот могут быть составлены по принципам, описанным, к примеру, в Creighton (1984). Proteins: Structure and Molecular Properties (2nd Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.

При введении вставок в гипервариабельный участок для создания варианта антитела следует учитывать типичный интервал длины данного гипервариабельного участка в известных антителах. Например, для первого гипервариабельного участка вариабельного домена легкой цепи можно делать вставки в отрезок CDR1 области V_L исходного антитела, сохраняя практически такой же и при этом ожидаемый надлежащий размер, который согласно Kabat et al., supra, обычно в целом составляет 9-20 (например, 10-17) остатков. Аналогичным образом, общая длина CDR2 области V_L обычно составляет 5-10 остатков; длина CDR3 области V_L обычно составляет 7-20 остатков; длина CDR1 области V_H обычно составляет 10-15 остатков; длина CDR2 области V_H обычно составляет 15-20 остатков; а длина CDR3 области V_H обычно составляет 6-30 остатков (например, 3-25 остатков). Вставки в область V_H обычно вводятся в участок CDR3, как правило, возле С-конца домена, как-то остатки 97-102 исходного CDR3 области V_H (например, рядом с или в сторону С-конца от остатка № 100 исходной последовательности CDR3 V_H), используя совмещение и нумерацию, описанные в Kabat. Варианты антител со вставками аминокислотных остатков в их гипервариабельные участки могут создаваться по случайной схеме, особенно если ис-

ходная аффинность связывания исходного антитела к антигену мишени такова, что созданные случайным образом варианты антител легко поддаются скринингу. Например, удобным методом скрининга таких случайных вариантов является фаговый дисплей.

В следующем воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело, которое отличается способностью к конкуренции (конкурентному ингибированию) или перекрестной конкуренции (т.е. взаимному частичному ингибированию связывания эпитопа) за связывание с CD38 с антителом, имеющим последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7 (например, антителом -003), или антителом, имеющим последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17 (например, антителом -005), или антителом, имеющим последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27 (например, антителом -024). Такое антитело может представлять собой, к примеру, Fab-фрагмент из антитела, связывающегося с эпитопом, идентичным или перекрывающимся с тем эпитопом, с которым связывается антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7, или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17, или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27. Конкуренция за связывание с CD38 или частью CD38 между двумя и больше антителами может определяться любым подходящим методом. В одном воплощении конкуренция определяется, к примеру, как описано в примерах 7-9.

Часто конкуренция отличается значительно большим относительным ингибированием, чем на 5% при определении методом ELISA и/или FACS. Может оказаться желательным установление более высокого порога относительного ингибирования в качестве критерия того, что является подходящим уровнем конкуренции в определенном контексте (например, если анализ конкурентности применяется для отбора или скрининга новых антител, предназначенных для блокирования связывания другого пептида или молекул с CD38 (например, таких естественных партнеров по связыванию с CD38, как CD31, также называемый антигеном CD31, EndoCAM, GPIIA', PECAM-1, молекулы адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам или природные антитела к CD38). Так, к примеру, можно установить такой критерий конкурентности, при котором должно отмечаться относительное ингибирование по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15% или по меньшей мере на 20%, чтобы антитело считалось достаточно конкурентным. В тех случаях, когда принадлежащие конкурирующим антителам эпитопы расположены рядом на антигене, конкуренция может отличаться относительным ингибированием связывания CD38 больше, чем на 40% (например, по меньшей мере на 45%, как-то по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 55%, как-то по меньшей мере на 60%, к примеру, по меньшей мере на 65%, как-то по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере на 75%, как-то по меньшей мере на 80%, к примеру, по меньшей мере на 85%, как-то по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%) или еще большей степенью относительного ингибирования.

В следующем воплощении используемое в изобретении неагонистическое антитело к CD38 представляет собой антитело, которое специфически связывается с тем эпитопом CD38, с которым также специфически связывается антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024).

Эпитоп CD38, с которым связывается антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024), может быть установлен стандартными методами картирования и характеризации, а более точная идентификация может осуществляться любым подходящим методом, многочисленные примеры которых доступны специалистам. Эти же методы могут применяться и для идентификации и/или характеризации эпитопов для антител к CD38 в общем случае. В качестве одного из примеров таких методов картирования/характеризации можно определить эпитоп для антитела к CD38 методом "футпринтинга" с помощью химической модификации выходящих на поверхность аминов/карбоксилов у белка CD38. Конкретным примером такого метода "футпринтинга" является метод HXMS (обмен водород-дейтерий с масс-спектрометрическим детектированием), в котором между протонами амидогрупп рецептора и белкового лиганда происходит обмен водорода на дейтерий, связывание и обратный обмен, при этом участвующие в связывании белков амидогруппы основной цепи будут защищены от обратного обмена и поэтому останутся дейтерированными. На этой стадии можно идентифицировать соответствующие участки при помощи протеолиза пепсином, разделения методом быстрой микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и/или масс-спектроскопии с ионизацией электрораспылением. Например, см. Ehring H., Analytical Biochemistry, 267(2) 252-259 (1999); и/или Engen J.R. and Smith D.L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Другим примером подходящего метода идентификации эпитопов является картирование эпитопов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР), в

котором, как правило, сравнивают положения сигналов на двумерных спектрах ЯМР от свободного антигена и антигена, образовавшего комплекс с антигенсвязывающим пептидом, как-то антителом. Антиген обычно метят избирательно изотопом ^{15}N, так что на спектре ЯМР видны только сигналы, соответствующие антигену, но нет сигналов от антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена, исходящие от аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, как правило, подвергаются смещению на спектрах комплекса в сравнении со спектрами свободного антигена, и поэтому можно идентифицировать аминокислоты, участвующие в связывании. Например, см. Ernst Schering Res. Found. Workshop, (44), 149-67 (2004); Huang et al., Journal of Molecular Biology, 281(1), 61-67 (1998) и Saito and Patterson, Methods 9(3), 516-24 (1996).

Картирование/характеризация эпитопов также может осуществляться методами масс-спектрометрии. Например, см. Downward, J Mass Spectrom. 35(4), 493-503 (2000) и Kiselar and Downard, Anal Chem. 71(9), 1792-801 (1999).

Методы расщепления протеазами тоже могут быть полезными при картировании и идентификации эпитопов. Методом расщепления протеазами могут быть установлены относящиеся к антигенным детерминантам участки/последовательности, например, используя расщепление трипсином в соотношении 1:50 к CD38 в течение ночи при 37°C и pH 7-8, с последующим масс-спектрометрическим (MS) анализом для идентификации пептидов. После этого можно идентифицировать пептиды, защищенные антителами от расщепления трипсином, при сравнении образцов, подвергнутых расщеплению трипсином, и образцов, проинкубированных с антителами, а затем подвергнутых расщеплению трипсином (при этом открываются "футпринты" того, что связывается). Другие ферменты, такие как химотрипсин, пепсин и т.п., тоже или в качестве альтернативы можно использовать в аналогичном методе характеризации эпитопов. Антитело, дающее практически такой же результат, как и антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17 (например, антитело
-005), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024), при этих измерениях считается связывающимся с тем же эпитопом, что и антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 2 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 12 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антитело, имеющее последовательность V_L по SEQ ID NO: 22 и последовательность V_H по SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024) соответственно. Например, см. обсуждение аналогичных методов в Manca, Ann Ist Super Sanita. 27(1), 15-9 (1991).

Другие методы, потенциально полезные при картировании эпитопов, включают кристаллографические методы, методы рентгеноструктурного анализа (например, методы рентгеноструктурного анализа/исследования последовательностей, разработанные Poljak и др. в 1970-1980 г.г.) и применение технологии многоконтактного синтеза пептидов. Компьютерные методы, такие как анализ последовательностей и анализ трехмерной структуры и стыковки, также можно использовать для идентификации антигенных детерминант. Например, можно определять эпитопы и методом молекулярного моделирования, используя структуру CD38 с посадкой структуры Fab-фрагмента отдельного моноклонального антитела. Эти и другие методы картирования обсуждаются в Epitope Mapping: A Practical Approach (Westwood and Hay Eds.), 200, 1 Oxford University Press.

Используемые в настоящем изобретении антитела могут обладать любой подходящей аффинностью и/или авидностью к одному или нескольким эпитопам, содержащимся хотя бы частично в CD38. Аффинность (сродство) относится к силе связывания антитела с таким эпитопом. Как правило, аффинность измеряется при помощи константы диссоциации K_d, которая определяется как [Ab]×[Ag]/[Ab-Ag], где [Ab-Ag] означает молярную концентрацию комплекса антитело-антиген (или комплекса антиген-антитело), [Ab] означает молярную концентрацию несвязанного антитела, а [Ag] означает молярную концентрацию несвязанного антигена. Константа аффинности K_a определяется как $1/K_d$. Подходящие методы определения специфичности и аффинности по конкурентному ингибированию можно найти, к примеру, в Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N.Y. (1992, 1993) и Muller, Meth. Enzymol. 92, 589-601 (1983).

Используемые в настоящем изобретении антитела к CD38 могут обладать сродством по меньшей мере к одному эпитопу, хотя бы частично содержащемуся в CD38, в интервале от 10^4 до 10^{10} M^{-1}. Такие антитела могут обладать, по меньшей мере, таким же сродством к CD38, как и антитела -003, -005 и -024, а в некоторых воплощениях они обладают почти таким же сродством к CD38, как и антитела -003, -005 и -024. Сродство (аффинность) можно определять любым из методов, описанных в настоящем изобретении, либо их эквивалентов, известных в этой области. Пример одного из методов, который можно использовать для определения сродства, приведен в статье Scatchard analysis of Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980). Сродство связывания можно определять и равновесными методами, к примеру методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) или радиоиммуноанализа (RIA) либо анали-

зом кинетики (например, методом BIACORE™).

Как правило, константа диссоциации у используемых в настоящем изобретении антител к CD38 составляет менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, около 5 нМ или меньше, 1 нМ или меньше, 0,5 нМ или меньше, 0,1 нМ или меньше, 0,01 нМ или меньше и даже 0,001 нМ или меньше.

Неограничивающие примеры антител к CD38, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают (a) полные функциональные молекулы иммуноглобулинов, включающие (i) две идентичные химерные тяжелые цепи, содержащие вариабельную область со специфичностью к поверхностному антигену B-клеток человека и константную область человека, и (ii) две идентичные нехимерные легкие цепи человека; (b) полные функциональные молекулы иммуноглобулинов, включающие (i) две идентичные химерные тяжелые цепи, содержащие вариабельную область, как указано выше, и константную область человека и (ii) две идентичные нехимерные легкие цепи, кроме человека; (c) моновалентные антитела, т.е. полные функциональные молекулы иммуноглобулина, включающие (i) две идентичные химерные тяжелые цепи, содержащие вариабельную область, как указано выше, и константную область человека и (ii) две различные легкие цепи, из которых только одна обладает такой же специфичностью, что и вариабельная область тяжелых цепей. В результате этого молекула антитела связывается только с одним его концом и поэтому не обладает способностью к двухвалентному связыванию. В качестве другого примера можно сказать, что родственные иммуноглобулинам пептиды, предусмотренные настоящим изобретением, включают следующее: (a) целые молекулы иммуноглобулинов; (b) scFv; (c) моноклональные антитела; (d) антитела человека; (e) химерные антитела; (f) гуманизированные антитела; (g) Fab-фрагменты; (h) Fab'-фрагменты; (i) $F(ab')_2$-фрагменты; (j) Fv-молекулы и (k) связанные дисульфидными связями Fv-молекулы.

В одном воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой поликлональные антитела. В другом воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой моноклональные антитела. В следующем воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой моноклональные антитела человека. В другом воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой гуманизированные антитела. В следующем воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой химерные антитела. В другом воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой моноклональные антитела, полностью происходящие из другого вида млекопитающих, чем человек. В следующем воплощении используемые в настоящем изобретении антитела представляют собой полностью мышиные моноклональные антитела.

В одном воплощении используемые в изобретении антитела подвергаются гликозилированию в эукариотических клетках. В другом воплощении используемые в изобретении антитела дополнительно содержат линкер-хелатор для присоединения радиоизотопа. В следующем воплощении используемые в изобретении антитела существуют практически в виде выделенного препарата.

Моноклональные антитела относятся к композициям, содержащим гомогенную популяцию антител с одинаковой структурой и специфичностью. Как правило, моноклональные антитела представляют собой антитела, полученные из популяции практически гомогенных антител, т.е. составляющие популяцию индивидуальные антитела идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть в небольшом количестве. Моноклональные антитела высокоспецифичны, а каждое моноклональное антитело обычно направлено против одного эпитопа, в противоположность препаратам поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против разных эпитопов. Моноклональность антител не следует понимать так, будто для их получения требуется какой-то определенный метод. Например, моноклональные антитела настоящего изобретения могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975), или методами рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител при помощи методов, описанных, к примеру, в Clackson et al., Nature, 352, 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991).

Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела можно получить из гибридом, полученных из B-клеток селезенки мышей, иммунизованных заданным антигеном, к примеру, в виде клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей заданный антиген. Моноклональные антитела также можно получить из гибридом, происходящих из экспрессирующих антитела клеток подвергнутых иммунизации людей или таких млекопитающих, как крысы, собаки, приматы и др.

В качестве альтернативы можно экспрессировать клонированные гены антител в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, к примеру, такие микроорганизмы, как E.coli, для получения одноцепочечных Fv-антител, водоросли, а также клетки насекомых. Кроме того, антитела можно вырабатывать в трансгенных животных, например в молоке овец и кроликов или в куриных яйцах, либо в трансгенных растениях. Например, см. Verma R. et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181 (1998); Pollock et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-157 (1999) и Fischer R. et al., Biol. Chem. 380, 825-839 (1999).

В одном воплощении моноклональные антитела человека против CD38 могут быть созданы с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих часть иммунной системы человека,

а не мыши. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, именуемых мышами HuMAb и KM соответственно, и собирательно именуются "трансгенными мышами". Моноклональные антитела человека, созданные у таких мышей, сокращенно называются HuMab.

Мыши HuMAb содержат мини-локус генов иммуноглобулина человека, который кодирует неизмененные последовательности тяжелых (μ и γ) и легких (κ) цепей иммуноглобулина человека, вместе с направленными мутациями, инактивирующими эндогенные локусы μ- и κ-цепей (Lonberg N. et al., Nature, 368, 856-859 (1994)). Соответственно, эти мыши проявляют снижение экспрессии IgM или κ-цепей в ответ на иммунизацию, а введенные трансгены тяжелых и легких цепей человека подвергаются перестройке изотипа и соматическим мутациям для вырабатывания высокоаффинных моноклональных антител IgG,κ человека (Lonberg N. et al. (1994), supra; см. обзоры в Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology, 113, 49-101 (1994); Lonberg N. and Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995) и Harding F. and Lonberg N., Ann. N.Y. Acad. Sci. 764, 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992); Chen J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993); Tuaillon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994); Taylor L. et al., International Immunology, 6, 579-591 (1994); Fishwild D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Также см. US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874,299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7 содержат разрыв JKD в своих эндогенных генах легких цепей (κ) (как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), разрыв CMD в своих эндогенных генах тяжелых цепей (как описано в примере 1 из WO 01/14424), трансген KCo5 легкой κ-цепи человека (как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996)) и трансген HCo7 тяжелых цепей человека (как описано в US 5770429).

Мыши HCo12 содержат разрыв JKD в своих эндогенных генах легких цепей (κ) (как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), разрыв CMD в своих эндогенных генах тяжелых цепей (как описано в примере 1 из WO 01/14424), трансген KCo5 легкой κ-цепи человека (как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996)) и трансген HCo12 тяжелых цепей человека (как описано в примере 2 из WO 01/14424). У линии мышей KM эндогенный ген легкой κ-цепи мыши был подвергнут гомозиготному разрыву, как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), а эндогенный ген тяжелой цепи мыши был подвергнут гомозиготному разрыву, как описано в примере 1 из WO 01/09187. Эта линия мышей несет трансген KCo5 легкой κ-цепи человека, как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996). Эта линия мышей также несет трансхромосому тяжелых цепей человека, состоящую из фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, как описано в WO 02/43478.

Мыши KM содержат трансхромосому тяжелых цепей человека и трансген легкой κ-цепи человека. К тому же, у мышей KM эндогенные гены тяжелых и легких цепей мыши были разорваны таким образом, что иммунизация этих мышей ведет к вырабатыванию иммуноглобулинов человека, а не иммуноглобулинов мыши. Конструирование мышей KM и их применение для выработки иммуноглобулинов человека описаны подробно в WO 02/43478. Спленоциты из этих трансгенных мышей можно использовать для создания гибридом, секретирующих моноклональные антитела человека, в соответствии с хорошо известными методами.

Используемые в настоящем изобретении моноклональные или поликлональные антитела человека либо антитела, происходящие из других видов, могут быть получены трансгенным способом путем создания другого млекопитающего или растения, трансгенного по заданным последовательностям тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, и продукции антител в форме, позволяющей их выделение. Что касается трансгенной продукции у млекопитающих, то антитела можно вырабатывать и выделять из козьего, коровьего молока или других млекопитающих. Например, см. US 5827690, US 5756687, US 5750172 и US 5741957.

Далее, используемые в настоящем изобретении антитела человека либо антитела из других видов могут быть получены по технологии типа дисплея, в том числе фагового дисплея, ретровирусного дисплея, рибосомного дисплея и других, используя методы, хорошо известные в этой области, а полученные молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, как-то созреванию аффинности, так как такие методы хорошо известны в данной области (например, см. Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (фаговый дисплей); Vaughan et al., Nature Biotech. 14, 309 (1996) (фаговый дисплей); Hanes and Plucthau, PNAS USA, 94, 4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей); Parmley and Smith, Gene, 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей); Scott, TIBS, 17, 241-245 (1992); Cwirla et al., PNAS USA, 87, 6378-6382 (1990); Russel et al., Nucl. Acids Research. 21, 1081-1085 (1993); Hoogenboom et al., Immunol. Reviews, 130, 43-68 (1992); Chiswell and McCafferty, TIBTECH. 10, 80-84 (1992) и US 5733743)). Если технология дисплея применяется для получения антител, не принадлежащих человеку, то такие антитела могут быть подвергнуты гуманизации, например, как описано в настоящем изобретении.

Примеры способов получения гуманизированных антител можно найти, к примеру, в US 6054297, US 5886152 и US 5877293. К тому же известно использование кДНК Ig для конструирования химерных

генов иммуноглобулина (например, см. Liu et al., PNAS USA, 84, 3439 (1987) и J. Immunol. 139, 3521 (1987).

Антитела к CD38 могут быть выделены из рекомбинантных комбинаторных библиотек антител, как-то библиотек фагового дисплея scFv, которые могут быть получены с помощью кДНК V_L и V_H человека, полученных из мРНК, выделенной из лимфоцитов человека. Методы получения и скрининга таких библиотек известны в этой области. Имеется целый ряд коммерческих наборов для создания библиотек фагового дисплея. Также есть и другие методы и реагенты, которые можно использовать при создании и скрининге библиотек дисплея антител (например, см. US 5223409, WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, Fuchs et al., Bio/Technology, 9, 1370-1372 (1991); Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 3, 81-85 (1992); Huse et al., Science, 246, 1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature, 348, 552-554 (1990); Griffiths et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993), Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992); CLackson et al., Nature, 352, 624-628 (1991); Gram et al., PNAS USA, 89, 3576-3580 (1992); Garrad et al., Bio/Technology, 9, 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19, 4133-4137 (1991) и Barbas et al., PNAS USA, 88, 7978-7982 (1991)). Подходящие нуклеотидные последовательности V_L и V_H могут быть выбраны любым надлежащим способом. Например, нуклеиновые кислоты V_L и V_H могут быть выбраны с применением методов импринтинга эпитопа, описанных в WO 93/06213. Можно получить и скринировать библиотеки антител, например библиотеки scFv, используя известные и подходящие методы (с помощью содержащих CD38 пептидов человека в качестве антигена типа тех, что описаны, к примеру, в WO 92/01047; McCafferty et al., Nature, 348, 552-554 (1990) и Griffiths et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993). Такие библиотеки антител являются предметом настоящего изобретения и могут применяться в терапии для обеспечения более всестороннего иммунного ответа, как инструменты в методах скрининга иммуногенных пептидов, небольших молекул, других антител к CD38 (например, при анализе конкурентности) и т.п. и/или в методах диагностики и композициях (например, можно получить стандартными методами чипы для иммуноанализа, содержащие комплект таких антител, необязательно вместе с другими антителами). После отбора исходных сегментов V_L и V_H человека можно проводить эксперименты типа "смешать и подобрать", в которых различные пары выбранных исходных сегментов V_L и V_H подвергают скринингу на связывание содержащих CD38 пептидов, чтобы отобрать желательные комбинации пар V_L/V_H. Так, можно определять реактивность пептидов методом ELISA или другим подходящим методом анализа эпитопов (например, см. обсуждение таких методов и принципов в Scott J.K. and Smith G.P., Science, 249, 386-390 (1990); Cwirla et al., PNAS USA, 87, 6378-6382 (1990); Felici et al., J. Mol. Biol. 222, 301-310 (1991) и Kuwabara et al., Nature Biotechnology, 15, 74-78 (1997)). Антитела можно отбирать по сродству к антигену и/или по кинетике диссоциации (скорости диссоциации) от антигена (к примеру, см. Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992)).

Из таких библиотек можно выделять и такие высокоаффинные пептиды антител, как одноцепочечные Fv (scFv) и Fab-фрагменты антител человека, используя метод пэннинга, в котором заданный антиген иммобилизируют на твердой поверхности типа микропланшета или шариков (например, см. Barbas and Burton, Trends Biotechnol. 14, 230-234 (1996); и Aujame et al., Hum. Antibodies 8, 155-168 (1997)). Фаговый дисплей больших наивных библиотек дает возможность выделять антитела человека непосредственно без иммунизации (например, см. de Haard et al., J. Biol. Chem. 274(26), 18218-18230 (1999)).

Антитела, пригодные для применения в настоящем изобретении, можно отбирать по их способности или неспособности обеспечивать фиксацию комплемента. Имеется ряд изотипов антител, способных фиксировать комплемент и CDC, в том числе следующие: IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3 мыши, IgM, IgG1 и IgG3 человека. К этим изотипам не относятся IgG2 и IgG4 человека. Методы определения изотипа и другие методы модифицирования фиксации комплемента и функциональных характеристик CDC антител известны в этой области.

Антитела к CD38, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены при рекомбинантной экспрессии в любом подходящем типе клеток или животных. Соответствующие методы получения антител известны в этой области и включают методы, описанные, к примеру, в Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Harlow and Lane: Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); US 4376110 и Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N.Y. (1987, 1992). Моноклональные антитела могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975), или иным, разработанным позже методом (например, см. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Гибридомы, применимые при получении антител к CD38 настоящего изобретения, также предусмотрены настоящим изобретением. Такие гибридомы могут быть созданы химическим, электрическим или любым другим подходящим методом слияния любого подходящего типа клеток миеломы, гетеромиеломы, плазмацитомы или эквивалентных им с любым подходящим типом клеток, экспрессирующих антитела. Для эффективного получения антител настоящего изобретения можно использовать и трансформированные "бессмертные" В-клетки, которые также предусмотрены настоящим изобретением. Такие клетки могут быть получены такими стандартными методами, как трансформация с помощью вируса Эпштейна-Барра или трансформирующего гена (например, см. "Continuously Proliferating Human Cell

Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity", Zurawski V.R. et al. in Monoclonal Antibodies, ed. by Kennett R.H. et al., Plenum Press, N.Y. 1980, p. 19-33).

Рекомбинантные клетки, экспрессирующие экзогенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к CD38, могут быть получены любым подходящим методом (например, трансфекции/трансформации с помощью несущего ДНК плазмидного вектора, вирусного вектора, проникающего в бактериальные клетки вектора или иного вектора для целых клеток и т.д., содержащего кодирующую антитело последовательность или последовательности, которые вводятся в клетки при облегченной фосфатом кальция трансфекции, опосредованном рецепторами таргетинге и трансфекции, биолистической доставке, электропорации, облегченной декстраном трансфекции, опосредованной липосомами трансформации, слиянии протопластов, прямой микроинъекции и т.п.). Методы трансформации/трансфекции клеток хорошо известны в этой области (например, см. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd Edition, 1989 and 3rd Edition, 2001) и F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience, New York (1987). Такие рекомбинантные клетки являются предметом настоящего изобретения.

Клеточные линии, доступные в качестве хозяина для экспрессии рекомбинантных белков, хорошо известны и охватывают многие "бессмертные" линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, среди прочего, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почек новорожденного хомячка (BHK), клетки почек макаки (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и ряд других линий клеток. Можно использовать и другие клеточные линии - линии клеток насекомых, например клетки Sf9. При введении нуклеиновых кислот (или содержащих нуклеиновые кислоты векторов), кодирующих такие белки, как антитела к CD38, в клетки-хозяева млекопитающего эти белки можно получать при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии белка в клетках-хозяевах, либо при секреции белка в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Из культуральной среды можно выделить антитела, используя стандартные методы очистки белков. Также можно выделить антитела из лизата клеток-хозяев при непосредственной экспрессии их без секреторного сигнала.

При введении в клетки-хозяева млекопитающего рекомбинантных экспрессионных векторов, кодирующих гены антител к CD38, антитела вырабатываются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или для секреции антител в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Очистка антител из клеточных культур, лизатов клеток и животных (например, из асцитной жидкости трансгенного животного, вырабатывающего антитела к CD38) может осуществляться с применением любого из числа подходящих методов, известных в этой области, включая, к примеру, иммуноаффинную колоночную хроматографию, осаждение сульфатом, хроматофокусирование, препаративный SDS-PAGE и др.

Моноклональные антитела человека по настоящему изобретению также можно получать и рядом других методов, включая стандартную методологию моноклональных антител, например, стандартный метод гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, Nature, 256, 495 (1975). Можно использовать и другие методы получения моноклональных антител, например методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека. В одном воплощении антитела к CD38 по настоящему изобретению получают с помощью гибридом, полученных в мышиной системе. Получение гибридом у мышей является очень хорошо разработанной процедурой. Методики иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в этой области. Также известны партнеры для слияния (например, клетки миеломы мышей) и методики слияния.

Для создания моноклональных антител к CD38, полностью принадлежащих человеку, можно подвергнуть иммунизации трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены иммуноглобулина человека (например, мышей HCo12, HCo7 или KM), с помощью обогащенного препарата антигена CD38 и/или клеток, экспрессирующих CD38, как описано, к примеру, в Lonberg et al., (1994), supra, Fishwild et al., (1996), supra, и WO 98/24884. С другой стороны, мышей можно иммунизировать с помощью ДНК, кодирующей CD38 человека. Возраст мышей может составлять 5-16 недель при первом введении. Например, можно использовать обогащенный препарат (5-50 мкг) антигена CD38 для иммунизации мышей HuMAb внутрибрюшинно. В том случае, когда иммунизация с помощью очищенного или обогащенного препарата антигена CD38 не вызывает образования антител, мышей можно подвергнуть иммунизации с помощью клеток, экспрессирующих CD38, например клеточной линии, чтобы усилить иммунные ответы.

Накопленный с различными антигенами опыт показывает, что трансгенные мыши HuMAb дают наилучшую реакцию при начальной иммунизации внутрибрюшинно (i.p.) или подкожно (s.c.) с помощью экспрессирующих CD38 клеток в полном адъюванте Фрейнда, с последующей иммунизацией раз в две недели i.p. (вплоть до 10 раз) с помощью экспрессирующих CD38 клеток в PBS. Иммунный ответ можно отслеживать на всем протяжении иммунизации, отбирая образцы плазмы из ретроорбитальных проб крови. Плазму можно подвергнуть скринингу методом FACS, а мышей с достаточным титром иммуноглобулина человека к CD38 можно использовать для слияния. Мышей можно подвергнуть повторной иммуни-

зации внутривенно с помощью экспрессирующих CD38 клеток, например, за 4 и 3 дня до забоя и извлечения селезенки.

Для получения гибридом, вырабатывающих моноклональные антитела человека к CD38 человека, можно выделить спленоциты и клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышей и слить их клетками надлежащей "бессмертной" линии, например линии клеток миеломы мышей. Затем полученные гибридомы можно подвергнуть скринингу на продукцию специфичных к антигену антител. Например, одноклеточные суспензии лимфоцитов селезенки из иммунизированных мышей можно слить с несекретирующими клетками SP2/0 миеломы мышей (ATCC, CRL 1581) с помощью 50% ПЭГ (мас./об.). Клетки можно засеять в плоскодонные планшеты примерно при 1×10^5 клеток/лунку, а затем инкубировать 2 недели в селективной среде, содержащей, помимо обычных реагентов, 10% эмбриональной сыворотки Clone Serum, 5-10% фактора клонирования гибридом Origen (IGEN) и 1×HAT (Sigma). Примерно через 2 недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменен на HT. Затем можно скринировать индивидуальные лунки методом ELISA на антитела, содержащие легкие к-цепи человека, и методом FACS на специфичность к CD38 с использованием CD38-экспрессирующих клеток. Среду можно отслеживать после того, как появится хороший рост гибридомы, обычно через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы можно пересеять, снова подвергнуть скринингу, и, если они окажутся положительными на IgG человека, можно субклонировать моноклональные антитела к CD38 как минимум два раза методом предельного разведения. Затем можно культивировать устойчивые субклоны in vitro, получая антитела в культуральной среде для исследования.

Антитела человека по настоящему изобретению также можно получать и в трансфектомах клеток-хозяев, например используя комбинации методов рекомбинантой ДНК и методов трансфекции генов, хорошо известные в этой области, к примеру, см. Morrison S., Science, 229, 1202 (1985).

Например, для экспрессирования антител или их фрагментов можно стандартными методами молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификации, направленного мутагенеза) получить ДНК, кодирующую частичные или полные легкие и тяжелые цепи, и вставить в экспрессирующий вектор таким образом, чтобы гены были функционально связаны с контролирующими транскрипцию и трансляцию последовательностями. В этой связи термин "функционально связаны" служит для обозначения того, что ген антитела вставлен в вектор таким образом, что контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности вектора должны выполнять и функцию регулирования транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и его контролирующие последовательности выбираются так, чтобы они были совместимы с используемыми для экспрессии клетками-хозяевами. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или же, чаще всего, оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антител можно встраивать в экспрессирующий вектор стандартными методами (например, лигированием комплементарных рестрикционных сайтов на фрагменте гена антитела и векторе либо лигированием по тупым концам, если нет рестрикционных сайтов). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, описанных в настоящем изобретении, можно использовать для создания полных генов антител любого изотипа, встраивая их в экспрессирующие векторы, которые уже кодируют константные области тяжелой цепи и легкой цепи требуемого изотипа таким образом, чтобы сегмент V_H был функционально связан с сегментом CH внутри вектора, а сегмент V_L был функционально связан с сегментом CL внутри вектора. Кроме того или в качестве альтернативы, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, облегчающий секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид находился в одной рамке считывания с N-концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид другого белка, чем иммуноглобулин).

Наряду с генами цепей антител, рекомбинантные экспрессионные векторы несут регуляторные последовательности, способствующие и контролирующие экспрессию генов цепей антител в клетках-хозяевах. Кроме того, рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, как-то последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, начало репликации), и гены селекционных маркеров. Гены селекционных маркеров облегчают селекцию тех клеток-хозяев, в которые был введен вектор (например, см. US 4399216, US 4634665 и US 5179017). Как правило, ген селекционного маркера придает устойчивость к таким препаратам, как G418, гигромицин или метотрексат, тем клеткам-хозяевам, в которые был введен вектор. Примеры генов селекционных маркеров включают ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR) (предназначенный для клеток-хозяев $dhfr^-$ при селекции/амплификации по метотрексату) и ген neo (для селекции по G418).

Для экспрессирования легких и тяжелых цепей в клетки-хозяева стандартными методами трансфицируют экспрессионный вектор, кодирующий тяжелые и легкие цепи. Клетками-хозяевами могут быть прокариотические или эукариотические клетки, как-то клетки млекопитающих. Например, антигенсвязывающие фрагменты можно экспрессировать в прокариотических клетках, а полномерные антитела можно экспрессировать в эукариотических клетках-хозяевах.

В одном воплощении антитела экспрессируют в эукариотических клетках-хозяевах, как-то клетках млекопитающих. Примеры клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по настоящему изобретению включают клетки CHO (включая клетки CHO dhfr$^-$, описанные в Urlaub and Chasin, PNAS USA, 77, 4216-4220 (1980), которые используются с селекционным маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp, Mol. Biol. 159, 601-621 (1982)), клетки миеломы NS/0, клетки COS, клетки HEK293 и клетки SP2.0. В частности, для клеток миеломы NS/0 другим примером системы экспрессии является система экспрессии гена GS (глутаминсинтетазы), раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841.

Гены антител можно экспрессировать и в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, как-то микроорганизмы, например, E. coli для получения антител scFv, водоросли, а также клетки насекомых. Кроме того, антитела можно вырабатывать в трансгенных животных, помимо человека, как-то в молоке овец и кроликов или куриных яйцах, либо в трансгенных растениях. Например, см. Verma, R. et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181 (1998); Pollock et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-157 (1999) и Fischer R. et al., Biol. Chem. 380, 825-839 (1999).

Биспецифичные и мультиспецифичные антитела.

В одном воплощении настоящего изобретения используются антитела, которые могут быть подвергнуты функционализации или присоединены к другой функциональной молекуле, например, к другому пептиду или белку (например, Fab'-фрагменту) для создания биспецифичной или мультиспецифичной молекулы, связывающейся с множественными центрами связывания или эпитопами мишени. Например, используемые в настоящем изобретении антитела могут быть функционально соединены (например, при помощи химической конъюгации, генетического слияния, нековалентной связи или иным способом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, как-то другим антителом, пептидом или связывающим аналогом.

Соответственно, настоящее изобретение включает применение биспецифичных и мультиспецифичных молекул, содержащих по меньшей мере одну первую специфичность связывания к CD38 и вторую специфичность связывания ко второму эпитопу-мишени. В одном воплощении настоящего изобретения вторым эпитопом-мишенью является Fc-рецептор, например FcγRI (CD64) человека или Fcα-рецептор (CD89) человека, либо Т-клеточный рецептор, например CD3. В одном воплощении настоящее изобретение предусматривает биспецифичные и мультиспецифичные молекулы, способные связываться с эффекторными клетками, экспрессирующими FcγR, FcαR или FcεR (например, моноцитами, макрофагами или полиморфн-оядерными клетками (PMNs)), и таргетировать клетки, экспрессирующие CD38. Эти биспецифичные и мультиспецифичные молекулы таргетируют CD38-экспрессирующие клетки к эффекторным клеткам и вызывают такие опосредованные Fc-рецепторами активности эффекторных клеток, как фагоцитоз CD38-экспрессирующих клеток, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), выделение цитокинов или образование аниона супероксида.

В одном воплощении используемые в настоящем изобретении биспецифичные и мультиспецифичные молекулы включают в качестве связывающей специфичности по меньшей мере еще одно антитело, например Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv или scFv. Дополнительное антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или какой-нибудь минимальный фрагмент, как-то Fv или одноцепочечную конструкцию, как описано Ladner et al. в US 4946778. Антитело также может представлять собой слитый со связывающим доменом иммуноглобулина белок, как изложено в US 2003/0118592 и US 2003/0133939.

В одном воплощении специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается моноклональным антителом человека, связывание которого не блокируется иммуноглобулином G (IgG) человека. В настоящем изобретении термин "рецептор IgG" относится к любому из 8 генов γ-цепи, локализованных на хромосоме 1. Эти гены в целом кодируют 12 трансмембранных или растворимых изоформ рецептора, которые входят в 3 класса Fc*-рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). В одном воплощении Fcγ-рецептор представляет собой высокоаффинный FcγRI человека. Получение и характеристика этих моноклональных антител описаны Fanger et al. в WO 88/00052 и в US 4954617. Эти антитела связываются с эпитопом FcγRI, FcγRII или FcγRIII по сайту, который отличается от Fcγ-связывающего сайта рецептора, поэтому их связывание практически не блокируется при физиологических уровнях IgG. Специфичные к FcγRI антитела, применимые в настоящем изобретении, - mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. В других воплощениях антитело к Fcγ-рецептору представляет собой гуманизированную форму mAb 22 (H22). Получение и характеристика антитела H22 описаны в Graziano R.F. et al., J. Immunol. 155(10), 4996-5002 (1995) и WO 94/10332. Продуцирующая антитело H22 линия клеток депонирована в Американской коллекции типовых культур 4 ноября 1992 г. под именем HA022CL1 и имеет номер доступа CRL 11177.

В одном воплощении специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается антителом, связывающимся с рецептором IgA человека, например, Fcα-рецептором (FcαI (CD89)), связывание которого в одном воплощении не блокируется иммуноглобулином A (IgA) человека. Термин "рецептор IgA" служит для обозначения генного продукта одного α-гена (FcαRI), локализованного на хромосоме 19. Из-

вестно, что этот ген кодирует несколько подвергающихся альтернативному сплайсингу трансмембранных изоформ от 55 до 110 кДа. FcαRI (CD89) экспрессируется конститутивно на моноцитах/макрофагах, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитах, но не на клетках, не относящихся к эффекторным популяциям. FcαRI обладает умеренным сродством к IgA1 и IgA2, которое повышается под воздействием таких цитокинов, как G-CSF или GM-CSF (Morton H.C. et al., Critical Reviews in Immunology, 16, 423-440 (1996)). Были описаны четыре специфичные к FcαRI моноклональные антитела, обозначенные как A3, A59, A62 и A77, которые связываются с FcαRI за пределами домена связывания лигандов IgA (Monteiro R.C. et al., J. Immunol. 148, 1764 (1992)).

FcαRI, FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в особенности FcγRII и FcγRIII, являются примерами пусковых рецепторов для применения в настоящем изобретении, так как они (1) экспрессируются главным образом на иммунных эффекторных клетках, например, моноцитах, PMNs, макрофагах и дендритных клетках; (2) экспрессируются на высоком уровне (к примеру, 5000-10000 на клетку); (3) являются медиаторами цитотоксической активности (например, ADCC, фагоцитоза) и (4) опосредуют усиление презентации направляемых к ним антигенов, включая аутоантигены.

Типичные молекулы биспецифичных антител включают (i) два антитела, одно со специфичностью к CD38, а другое - ко второй мишени, конъюгированные друг с другом, (ii) единственное антитело, у которого одна цепь специфична к CD38, а другая цепь специфична ко второй молекуле; и (iii) одноцепочечное антитело, обладающее специфичностью к CD38 и ко второй молекуле. Как правило, молекула второй мишени является другой, чем CD38. В одном воплощении вторая молекула представляет собой раковый антиген/опухолевый антиген, как-то карциноэмбриональный антиген (CEA), простата-специфический антиген (PSA), почечный антиген (RAGE), α-фетопротеин, CAMEL (CTL-распознаваемый антиген на меланоме), CT-антигены (такие как MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 и D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE и SAGE), антигены муцинов (например, MUC1, муцин-CA125 и др.), антигены ганглиозидов, тирозиназа, gp75, C-myc, Mart1, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7 и Ep-CAM. В другом воплощении вторая молекула представляет собой связанный с раком интегрин, например интегрин α5β3. В следующем воплощении вторая молекула представляет собой ангиогенный фактор или другой связанный с раком фактор роста, как-то фактор роста сосудистого эпителия (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ангиогенин и его рецепторы, в частности рецепторы, связанные с прогрессированием рака (например, один из рецепторов HER1-HER4). Другие белки, связанные с прогрессированием рака и приведенные в настоящем изобретении, также могут оказаться подходящими вторыми молекулами. В одном воплощении вторая молекула представляет собой такую молекулу, которая экспрессируется на поверхности клеток множественной миеломы, как-то CD138.

В одном воплощении используемые в настоящем изобретении биспецифичные антитела представляют собой диатела.

Используемые в настоящем изобретении биспецифичные и мультиспецифичные антитела могут быть получены химическими методами (например, см. D.M. Kranz et al., PNAS USA, 78, 5807 (1981)), "полидомными" методами (см. US 4474893) или методами рекомбинантной ДНК.

Конъюгаты

В одном воплощении настоящего изобретения используются антитела к CD38, конъюгированные с лекарственной молекулой, как-то цитотоксином, препаратом для химиотерапии, иммунодепрессантом или радиоизотопом. Такие конъюгаты в настоящем изобретении именуются "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, включающие один или несколько цитотоксинов, именуются "иммунотоксинами".

К цитотоксинам или цитотоксическим средствам относятся любые средства, которые губительны для клеток (например, убивают их). Описание этих классов лекарственных веществ, которые хорошо известны в данной области, и их механизмов действия см. в Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Другие методы, относящиеся к получению антител-иммунотоксинов, представлены, к примеру, в Vitetta, Immunol. Today, 14, 252 (1993) и US 5,194,594.

К подходящим лекарственным средствам для получения иммуноконъюгатов, применимых в настоящем изобретении, относятся таксол, цитохалазин B, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацендион, митоксантрон, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин,
6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие вещества (например, мехлорэтамин, тиоэпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин C, цисплатин и другие производные платины, как-то карбоплатин)), антибиотики (например, дактиномицин (прежний актиномицин), блеомицин, даунорубицин (прежний дауномицин), доксорубицин, идарубицин, митрамицин, калихеамицин, митомицин, ми-

токсантрон, пликамицин, антрамицин (AMC)), дифтерийный токсин и родственные молекулы (например, А-цепь дифтерийного токсина и её активные фрагменты и гибридные молекулы), рициновый токсин (например, рицин А или дегликозилированная А-цепь рицина), холерный токсин, Шига-подобные токсины (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), токсин LT, токсин С3, токсин Шига, коклюшный токсин, столбнячный токсин, соевый ингибитор протеаз Боумана-Бирка, экзотоксин Pseudomonas, алорин, сапорин, модекцин, геланин, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, α-сарцин, белки Aleurites fordii, белки диантина, белки Phytolacca americana (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор из Sapaonaria officinalis, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, токсины феномицин и эномицин.

Лекарственные средства, которые могут вводиться в сочетании с антителами, как описано далее в настоящем изобретении, тоже могут быть кандидатами для лекарственных молекул, применимых для конъюгирования с антителами, используемыми в настоящем изобретении. Например, лекарственная молекула может представлять собой белок или полипептид, обладающий требуемой биологической активностью. К таким белкам можно отнести, к примеру, энзиматически активные токсины или их активные фрагменты, такие как абрин, рицин А, экзотоксин Pseudomonas или дифтерийный токсин; такие белки, как фактор некроза опухолей или γ-интерферон; такие модификаторы биологических ответов, к примеру, как лимфокины, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF), колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF) или другие факторы роста; а также вызывающий апоптоз белок, выделенный из митохондрий.

Конъюгаты антител с такими цитотоксическими молекулами могут быть получены с помощью различных бифункциональных сшивающих реагентов. Примеры таких реагентов включают SPDP, IT, бифункциональные производные таких имидоэфиров, как диметиладипимидат·HCl, такие активные эфиры, как дисукцинимидилсуберат, такие альдегиды, как глутаральдегид, такие бис-азидосоединения, как бис-(п-азидобензоил)гександиамин, такие производные бис-диазония, как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин, такие диизоцианаты, как толилен-2,6-диизоцианат, и такие бис-активные соединения фтора, как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, и антимитотические вещества (например, винкристин, винбластин, доцетаксел, паклитаксел и винорелбин).

В одном воплощении настоящего изобретения используются антитела к CD38, конъюгированные с иммуномодулятором - иммуномодулирующим цитокином, фактором роста стволовых клеток, лимфотоксином (например, TNF типа TNFα) или гематопоэтическим фактором. Примеры таких молекул, которые могут применяться в качестве конъюгатов, включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 и IL-21, колониестимулирующие факторы (например, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF)), интерфероны (например, IFN-α, IFN-β и IFN-γ), фактор роста стволовых клеток, названный "фактором S1", эритропоэтин и тромбопоэтин, их активные фрагменты, производные, варианты или комбинации.

Методы конъюгирования таких лекарственных молекул с антителами хорошо известны, например см. Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62, 119-58 (1982).

Кроме того, к полезным заместителям для конъюгатов относятся противораковые ретиноиды. Полезными при лечении рака также могут оказаться и конъюгаты таксана (например, см. Jaime et al., Anticancer Res. 21(2A), 1119-28 (2001), конъюгаты цисплатина, конъюгаты тапсигаргина, конъюгаты линолевой кислоты, конъюгаты калихеамицина (например, см. Damle et al., Curr Opin Pharmacol. 3(4), 386-90 (2003), конъюгаты доксорубицина, конъюгаты гелданамицина и др. (в общем, см. Trail et al., Cancer Immunol. Immunother. 52(5), 328-37 (2003)).

Рецептура и способ применения

Используемые в настоящем изобретении средства могут быть заключены в фармацевтические композиции с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также любыми другими известными вспомогательными веществами и наполнителями в соответствии со стандартными методами типа тех, что изложены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные вспомогательные вещества и наполнители должны быть адекватными для выбранного соединения, используемого в настоящем изобретении, и выбранного способа применения. Адекватность в отношении носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется по отсутствию значительного отрицательного влияния на требуемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевти-

ческой композиции (например, не очень существенное влияние, т.е. относительное ингибирование на 10% или меньше, на 5% или меньше и т.д.) на связывание антигена.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, также могут включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент типа Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или аминокислоты, не содержащие белка), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фактический уровень дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать с тем, чтобы получить такое количество активного ингредиента, которое будет эффективным для достижения требуемой терапевтической реакции для определенного пациента, композиции и способа применения, но не будет токсичным для пациента. Выбираемый уровень дозы зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретной композиции соединения либо его эфира, соли или амида, способа применения, времени введения, скорости выделения конкретного соединения, продолжительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретными композициями, возраста, пола, веса, заболевания, общего состояния здоровья и истории болезни подвергающегося лечению пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическая композиция может вводиться любым подходящим способом и по любой подходящей схеме. Подходящие способы применения соединений настоящего изобретения in vivo и in vitro хорошо известны в этой области и могут быть выбраны рядовыми специалистами.

Используемые в настоящем изобретении соединения могут вводиться любым подходящим способом, как-то перорально, интраназально, путем ингаляции, местно (в том числе трансбуккально, трансдермально и под язык), интраректально, интравагинально и/или парентерально.

В одном воплощении одно или несколько соединений, используемых в настоящем изобретении, вводятся перорально, например, в инертном разбавителе или усвояемом съедобном носителе. Активный ингредиент может быть заключен в твердые или мягкие желатиновые капсулы, запрессован в таблетки или прямо включен в рацион субъекта. Фармацевтические композиции, пригодные для перорального введения, включают заглатываемые таблетки, буккальные таблетки, пастилки, капсулы, эликсиры, суспензии, сиропы, облатки и т.п., содержащие такие носители, которые известны в этой области как надлежащие. Чтобы облегчить прием внутрь, может потребоваться покрытие соединения или совместное введение соединения с материалом, предотвращающим его инактивацию.

В одном воплощении одно или несколько соединений, используемых в настоящем изобретении, вводятся парентерально.

Выражения "парентеральное введение" и "вводятся парентерально" в настоящем изобретении означают другие способы применения, чем энтеральное и местное введение, обычно с помощью инъекции, и охватывают эпидермальные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрисуставные, подглазничные, внутрисердечные, интрадермальные, внутрибрюшинные, внутрисухожильные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидные, интраспинальные, внутричерепные, интраторакальные, эпидуральные и внутригрудинные инъекции и вливания.

В одном воплощении соединения вводятся путем внутривенной или подкожной инъекции или вливания.

В одном воплощении соединения, используемые в настоящем изобретении, вводятся в кристаллическом виде путем подкожной инъекции, см. Yang et al., PNAS USA, 100(12), 6934-6939 (2003).

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, могут быть составлены для определенного способа применения, как-то перорального, интраназального, местного (в том числе трансбуккального, трансдермального и под язык), интраректального, интравагинального и/или парентерального применения. Фармацевтические композиции могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно сочетать с материалом носителя для получения стандартной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подлежащего лечению субъекта и конкретного способа применения. Количество активного ингредиента, которое можно сочетать с материалом носителя для получения стандартной лекарственной формы, в общем, должно быть таким, чтобы композиция оказывала терапевтический эффект. Обычно из 100% это количество составляет от 0,01 до 99% активного ингредиента, как-то от 0,1 до 70%, например от 1 до 30%.

Независимо от выбранного способа применения используемые в настоящем изобретении соединения, которые могут использоваться в виде фармацевтически приемлемой соли или в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции заключаются в фармацевтически приемлемые лекарственные формы стандартными методами, известными специалистам в этой области. "Фармацевтически приемлемая соль" означает такую соль, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательных токсикологических эффектов (например, см. Berge S.M. et al., J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977)). Примеры таких солей включают соли, образованные с

кислотами, и соли, образованные с основаниями. Соли, образованные с кислотами, включают соли, образованные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная кислота, фосфористая кислота и др., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и др. Соли, образованные с основаниями, включают соли, образованные с щелочноземельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и др., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и др.

Фармацевтически приемлемые носители охватывают всевозможные подходящие растворители, дисперсионные среды, антибактериальные и противогрибковые средства, вещества, поддерживающие изотоничность, антиоксиданты, задерживающие всасывание вещества и др., которые физиологически совместимы с соединениями, используемыми в настоящем изобретении.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, включают воду, физраствор, физраствор с фосфатным буфером, этанол, декстрозу, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтилен-гликоль и др.) и их подходящие смеси, растительные масла, как-то оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцелюлозы, камедь трагаканта и такие пригодные для инъекций органические эфиры, как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления ex tempore стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какая-то стандартная среда или вещество несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях.

Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, применением таких покровных материалов, как лецитин, соблюдением требуемого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции, содержащие используемые в настоящем изобретении средства, также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и др.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, α-токоферол и др.; и (3) хелаторы металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и др.

Фармацевтические композиции также могут содержать вещества, поддерживающие изотоничность, как-то сахара, такие многоатомные спирты, как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия в композициях.

К фармацевтически приемлемым разбавителям относятся физраствор и водные буферные растворы.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для выбранного способа применения, как-то консерванты, смачивающие вещества, эмульгирующие вещества, диспергирующие вещества, консерванты или буферы, которые могут повысить срок хранения или эффективность фармацевтической композиции. Соединения настоящего изобретения, к примеру, можно смешивать с лактозой, сахарозой, порошками (например, порошком крахмала), эфирами алкановых кислот с целлюлозой, стеариновой кислотой, тальком, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислоты, гуммиарабиком, желатином, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом. Другими примерами вспомогательных веществ являются QS21, GM-CSF, SRL-172, гистамина дигидрохлорид, тимокартин, Tio-TEPA, композиции монофосфорил-липид А/микобактерии, квасцы, неполный адъювант Фрейнда, монтанид ISA, система адъюванта ribi, адъювант TiterMax, композиции адъюванта syntex, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMs), адъювант gerbu, олигодезоксинуклеотиды CpG, липополисахарид и полиинозиновая:полицитидиловая кислота.

Защита от присутствия микроорганизмов может обеспечиваться как мероприятиями по стерилизации, так и добавлением различных антибактериальных и противогрибковых средств, к примеру, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и др. Кроме того, можно вызвать замедленное всасывание фармацевтических форм для инъекций добавлением таких веществ, замедляющих всасывание, как моностеарат алюмиия и желатин.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения настоящего изобретения, могут включать и их подходящие соли. Любые подходящие соли, как-то соли щелочноземельных металлов в любой подходящей форме (например, буферные соли), могут использоваться для стабилизации соединений, используемых в настоящем изобретении. К подходящим солям обычно относятся хлорид натрия, сукцинат натрия, сульфат натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат магния и хлорид кальция. В одном во-

площении для стабилизации соединений, используемых в настоящем изобретении в фармацевтических композициях, применяется соль алюминия, которая также может служить адъювантом при введении такой композиции пациентам.

Используемые в настоящем изобретении соединения могут быть приготовлены вместе с носителями, которые должны защищать соединения от быстрого выделения, как-то лекарственные формы с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, такие биоразрушимые, биосовместимые полимеры, как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота, отдельно или вместе с воском или иным материалом, хорошо известным в этой области. Методы приготовления таких лекарственных форм широко известны специалистам в этой области, например, см. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Для введения композиций при некоторых способах применения может потребоваться покрытие соединения или совместное введение его с материалом, предотвращающим его инактивацию. Например, используемые в способе изобретения соединения можно вводить субъекту в соответствующем носителе, к примеру, липосомах или разбавителе. Липосомы включают эмульсии CGF типа вода-масло-вода, а также стандартные липосомы (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

В зависимости от способа применения, активное соединение может быть покрыто материалом, защищающим его от действия кислот и других природных условий, которые могли бы инактивировать соединение. Например, соединение может вводиться субъекту в соответствующем носителе, к примеру, липосомах. Липосомы включают эмульсии CGF типа вода-масло-вода, а также стандартные липосомы (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

В одном воплощении настоящего изобретения соединения настоящего изобретения заключены в липосомы. В другом воплощении липосомы включают наводящую молекулу. В следующем воплощении соединения в липосомах вводятся при инъекции болюсом в место, ближайшее к пораженному участку, например, зоне воспаления или инфекции, либо по месту опухоли. Композиция должна быть жидкой в такой степени, чтобы её можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и защищена от заражающего действия таких микроорганизмов, как бактерии и грибки.

В одном воплощении используемые в настоящем изобретении соединения могут быть составлены так, чтобы предотвратить или уменьшить их транспорт через плаценту. Это можно сделать методами, известными в данной области, например пэгилированием соединений или использованием $F(ab')_2$-фрагментов. Также можно указать работы Cunningham-Rundles C. et al., J. Immunol. Methods, 152, 177-190 (1992) и Landor M., Ann Allergy Asthma Immunol. 74, 279-283 (1995).

Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления ex tempore стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в данной области, за исключением тех случаев, когда какая-то стандартная среда или вещество несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях. В композиции также могут вводиться вспомогательные активные соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения, Композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосом или иной упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного вещества. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, к примеру, воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и др.) и их подходящие смеси, растительные масла, как-то оливковое масло, и такие пригодные для инъекций органические эфиры, как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, применением таких покровных материалов, как лецитин, соблюдением требуемого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно в композиции нужно включать вещества, поддерживающие изотоничность, например, сахара, такие многоатомные спирты, как глицерин, маннит, сорбит, или хлорид натрия. Можно вызвать замедленное всасывание композиций для инъекций добавлением в композицию веществ, замедляющих всасывание, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены при введении активного соединения в требуемом количестве в надлежащий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. В общем случае дисперсии получают при введении активного соединения в стерильный носитель, содержащий щелочную дисперсионную среду и другие нужные ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами способов получения являются вакуумная сушка и замораживание-высушивание (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым другим требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены при введении активного соединения в требуемом количестве в надлежащий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. В общем случае дисперсии получают при введении активного соединения в стерильный носитель, содержащий щелочную дисперсионную среду и другие нужные ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами способов получения являются вакуумная сушка и замораживание-высушивание (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым другим требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

В одном воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан, причем мелфалан вводится внутривенно или перорально.

В другом воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, как-то талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC4047 (Actimid™), причем данное производное глутаминовой кислоты вводится перорально.

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой ингибитор протеасом, как бортезомиб (Velcade®), причем бортезомиб вводится внутривенно.

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой алкалоид барвинка, как винкристин, причем винкристин вводится внутривенно.

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает такой антрациклин, как доксорубицин, причем доксорубицин вводится внутривенно.

В другом воплощении способов изобретения данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, причем преднизон вводится перорально.

Пациенты и подлежащие лечению заболевания

К лицам, подлежащим лечению с помощью комбинированной терапии по изобретению, могут относиться, к примеру, больные люди, страдающие нарушениями, которые могут быть исправлены или облегчены при ингибировании таких функций CD38, как энзиматическая активность, передача сигналов, индукция экспрессии цитокинов, индукция пролиферации или дифференцировки и/или индукция лизиса, и/или при устранении/уменьшении числа экспрессирующих CD38 клеток.

Например, можно использовать антитела к CD38, чтобы вызвать in vivo или in vitro одну или несколько из следующих биологических активностей: ингибирование функций CD38 (например, энзиматической активности, передачи сигналов, индукции экспрессии цитокинов, индукции пролиферации или дифференцировки и/или индукции лизиса), уничтожение экспрессирующих CD38 клеток, опосредование фагоцитоза или ADCC у экспрессирующих CD38 клеток в присутствии эффекторных клеток человека и опосредование CDC у экспрессирующих CD38 клеток в присутствии комплемента или уничтожение экспрессирующих CD38 клеток путем апоптоза.

В одном воплощении можно использовать иммуноконъюгаты, описанные в настоящем изобретении, для доставки соединений (например, лекарственных средств, меток, цитотоксинов, иммунодепрессантов и т.п.) к клеткам, содержащим связанный на их поверхности CD38, используя такие прицельные соединения в качестве терапевтических молекул в иммуноконъюгатах настоящего изобретения.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены способы уничтожения клеток, содержащих связанный на их поверхности CD38, при введении иммуноконъюгатов настоящего изобретения.

В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения заболеваний с участием экспрессирующих CD38 клеток у субъекта, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества:

i) неагонистического антитела, связывающегося с CD38;

ii) по меньшей мере одного кортикостероида;

iii) по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

Антитела к CD38 используются для ингибирования индуцируемых CD38 активностей, связанных с определенными заболеваниями, либо для устранения или уменьшения числа экспрессирующих CD38 клеток.

В одном воплощении настоящего изобретения заболевания с участием клеток, экспрессирующих CD38, представляют собой опухолеродные заболевания, как-то заболевания, характеризующиеся наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, включая, к примеру, B-клеточные лимфомы, плазмоцитарные раковые опухоли, T/NK-клеточные лимфомы и миелоидные раковые опухоли.

Примеры таких опухолеродных заболеваний включают В-клеточные лимфомы/лейкемии, в том числе лимфобластическая лейкемия В-клеточных предшественников и В-клеточные лимфомы не-Ходжкина; острая промиелоцитарная лейкемия, острая лимфобластическая лейкемия и такие новообразования зрелых В-клеток, как хроническая В-клеточная лимфоцитарная лейкемия (CLL)/мелкая лимфоцитарная лимфома (SLL), острая В-клеточная лимфоцитарная лейкемия, В-клеточная пролимфоцитарная лейкемия, лимфоплазмоцитарная лимфома, мантиевидноклеточная лимфома (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая слабо выраженную, промежуточную и сильно выраженную FL, кожная центрально-фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома краевой зоны (тип MALT, узелковый и селезеночный тип), лейкоз ворсистых клеток, диффузная крупная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта, плазмоцитома, плазмоцитарная миелома, плазмоцитарная лейкемия, посттрансплантационная лимфопролиферативная болезнь, макроглобулинемии Вальденстрема, плазмоцитарная лейкемия и анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL).

В одном воплощении заболевание с участием экспрессирующих CD38 клеток представляет собой множественную миелому.

Примерами В-клеточных лимфом не-Ходжкина являются лимфоматоидный грануломатоз, первичная эффузионная лимфома, внутрисосудистая крупная В-клеточная лимфома, медиастинальная крупная В-клеточная лимфома, заболевания тяжелых цепей (включая заболевания γ-, μ- и α-цепей), лимфомы, индуцированные лечением иммуно-депрессантами, как-то индуцированная циклоспорином лимфома и индуцированная метотрексатом лимфома.

В одном воплощении настоящего изобретения заболевание с участием экспрессирующих CD38 клеток может представлять собой лимфому Ходжкина.

Примерами заболеваний с участием экспрессирующих CD38 клеток могут служить раковые опухоли, происходящие из Т- и NK-клеток, включая неоплазмы зрелых Т-клеток и NK-клеток, в том числе Т-клеточная пролимфоцитарная лейкемия, Т-клеточная крупная гранулярно-лимфоцитарная лейкемия, агрессивная NK-клеточная лейкемия, лейкемия/лимфома зрелых Т-клеток, внеузелковая NK/Т-клеточная лимфома носового типа, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома, подкожная гиподермитоподобная Т-клеточная лимфома, бластоцитарная NK-клеточная лимфома, грибовидная гранулема/синдром Сезари, первичные кожные лимфопролиферативные заболевания CD30-положительных Т-клеток (первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома C-ALCL, лимфоматоидный папулез, пограничные опухоли), ангиоиммунобластическая Т-клеточная лимфома, неопределенная периферическая Т-клеточная лимфома и анапластическая крупноклеточная лимфома.

Примеры раковых опухолей, происходящих из миелоидных клеток, включают острую миелоидную лейкемию, в том числе острую промиелоцитарную лейкемию, и хронические миелопролиферативные заболевания, в том числе хроническую миелоидную лейкемию.

Дозировки и схемы лечения

Лечение по настоящему изобретению включает использование "терапевтически эффективного количества" медикаментов. "Терапевтически эффективное количество" означает такое количество, которое, при необходимых дозах и продолжительности, будет эффективным для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума и способность медикаментов вызвать требуемую реакцию у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также означает такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или его части будут перевешиваться терапевтически полезными эффектами. В контексте настоящей комбинированной терапии терапевтическое количество включает количества, которые будут эффективными только в комбинации с другими соединениями, например, количества, слишком малые для того, чтобы быть эффективными при монотерапии.

"Терапевтически эффективное количество" для лечения опухолей также может быть измерено по его способности стабилизировать прогрессирование болезни. Способность соединения к торможению рака может быть оценена на животных в модельной системе, прогнозирующей его эффективность на опухолях человека. С другой стороны, это свойство композиции может быть оценено при исследовании способности соединения ингибировать рост клеток или индуцировать апоптоз in vitro методами, известными специалистам. Терапевтически эффективное количество лекарственного соединения может вызывать уменьшение размера опухолей либо иным образом облегчать симптомы у субъекта. Рядовой специалист в этой области сможет определить такое количество, исходя из таких факторов, как габариты субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная композиция или выбранный способ применения.

Схемы дозировки подбирают таким образом, чтобы обеспечить требуемую реакцию (например, терапевтическую реакцию). Например, дозы можно вводить одним болюсом, несколькими дробными дозами за какое-то время или же можно снижать либо повышать дозу пропорционально в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде стандартных лекарственных форм для облегчения введения и единообразия дозировки. Стандартная лекарственная форма в настоящем изобретении означает физически дискретные единицы, пригодные в ка-

честве однократных доз для подлежащих лечению субъектов, при этом каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на оказание требуемого терапевтического эффекта в сочетании с конкретным фармацевтическим носителем. Спецификация на стандартные лекарственные формы настоящего изобретения диктуется и прямо зависит от (a) уникальных характеристик активного соединения и заданного конкретного терапевтического эффекта и (b) ограничений, существующих в области составления рецептур таких активных соединений для лечения отдельных лиц.

Эффективные дозы и схемы дозировки для антител к CD38, используемых в настоящем изобретении, зависят от подлежащего лечению заболевания и могут быть установлены специалистами в этой области. Типичный неограничивающий интервал терапевтически эффективного количества антител к CD38, используемых в настоящем изобретении, составляет 0,1-100 мг/кг, как-то 0,1-50 мг/кг, например 0,1-20 мг/кг, как-то 0,1-10 мг/кг, например 0,5, как-то 0,3, 1 или 3 мг/кг. В другом воплощении антитела применяются в дозе 1 мг/кг или больше, как-то в дозе от 1 до 20 мг/кг, например в дозе от 5 до 20 мг/кг, например в дозе 8 мг/кг.

Рядовой врач или ветеринар легко может установить и предписать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать дозировку медикамента, используемого в фармацевтической композиции, с меньших доз, чем это нужно для достижения требуемого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозировку, пока не будет достигнут требуемый терапевтический эффект. В общем, подходящая суточная доза композиции настоящего изобретения должна составлять такое количество соединения, которое представляет собой наименьшую дозу, эффективно дающую терапевтический эффект. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше. Введение может осуществляться внутривенно, внутримышечно или подкожно, причем, к примеру, в ближайшее к мишени место. При желании эффективная суточная доза фармацевтической композиции может вводиться в виде 2, 3, 4, 5, 6 и больше дробных доз, вводимых по отдельности через соответствующие интервалы в течение суток, необязательно в виде стандартных лекарственных форм. Хотя соединения настоящего изобретения можно вводить и сами по себе, однако предпочтительно они вводятся в виде фармацевтической композиции, как описано выше.

В одном воплощении антитела к CD38 вводятся вливанием в недельной дозе от 10 до 500 мг/м^2, как-то от 200 до 400 мг/м^2. Такое введение может повторяться, например, от 1 до 8 раз, как-то от 3 до 5 раз. Введение может осуществляться непрерывным вливанием на протяжении от 2 до 24 ч, как-то от 2 до 12 ч.

В одном воплощении антитела к CD38 вводятся медленным непрерывным вливанием на протяжении длительного времени, как-то более 24 ч, чтобы уменьшить токсические побочные эффекты.

В одном воплощении антитела к CD38 вводятся в недельной дозе от 250 до 2000 мг, как-то, к примеру, 300, 500, 700, 1000, 1500 или 2000 мг, вплоть до 8 раз, как-то от 4 до 6 раз. Введение может осуществляться непрерывным вливанием на протяжении от 2 до 24 ч, как-то от 2 до 12 ч. Такая схема может быть повторена один или несколько раз по необходимости, к примеру, через 6 или 12 месяцев Дозировка может быть установлена или скорректирована путем измерения содержания соединения настоящего изобретения в крови после введения, к примеру, путем отбора биологических проб и использования анти-идиотипических антител, садящихся на антигенсвязывающий участок антитела к CD38.

В другом воплощении антитела к CD38 вводятся раз в неделю на протяжении от 2 до 12 недель, как-то от 3 до 10 недель, как-то от 4 до 8 недель.

В одном воплощении антитела к CD38 вводятся при поддерживающей терапии, как-то, например, раз в неделю на протяжении 6 месяцев или больше.

В одном воплощении антитела к CD38 вводятся по схеме, включающей одно вливание антител к CD38 с последующим вливанием антител к CD38, конъюгированных с радиоизотопом. Эта схема может быть повторена, например, спустя 7-9 дней.

В качестве неограничивающих примеров, лечение по настоящему изобретению может осуществляться в виде суточной дозы антител в количестве 0,1-100 мг/кг, как-то 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 день, по меньшей мере в один из дней 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 либо 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 же в любой комбинации, используя однократные или дробные дозы через каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч, или же в любой комбинации.

В одном воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан, а данный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон. Как правило, мелфалан вводится внутривенно (IV), но может вводиться и перорально (PO), например, в интервале 0,2-0,25 мг/кг в день или, к примеру, 7-9 мг/м^2. Преднизон, к примеру, может вводиться в дозе 2 мг/кг на протяжении 4 дней через каждые 4-6 недель (Alexanian et al., J. Am. Med. Assoc. 1969; 208:1680). В других воплощениях мелфалан может применяться в высоких дозах при однократных дозах вплоть до 140 мг/м^2 (IV) или промежуточных дозах в интервале от 25 до 75 мг/м^2 (IV); в качестве примера 40 мг в день при введении в 1-4, 9-12 и 17-20 дни каждого 5-недельного цикла

(Tsakanikas et al., Oncology, 1991, 48:369, Richardson PG, Am. J. Oncol. 2005, 4:737).

В другом воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид (Thalomid®), а данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон. Талидомид, например, можно использовать в дозе 200 мг в день (PO) либо в интервале от 50 до 400 мг в день вместе с дозой дексаметазона, например, 40 мг в день при ежедневном введении или последовательном введении, например, в 1-4, 9-12 и 17-20 дни каждого 28-дневного цикла (Rajkumar SV, J. Clin. Oncol. 2006, 24:431).

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает леналидомид, а данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон. Леналидомид, например, можно вводить в дозе 25 мг в день ежедневно (PO), а дексаметазон, например, в дозе 40 мг в день (PO) при введении, к примеру, в 1-4, 9-12 и 17-20 дни каждого 28-дневного цикла, после этого необязательно только в 1-4 дни каждого цикла (Rajkumar S.V., ASH 2004).

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает бортезомиб (Velcade®). Бортезомиб, например, может применяться в комбинации с дексаметазоном. Эта комбинация может применяться при индукционной и при поддерживающей терапии. В качестве примера бортезомиб 1,3 мг/м^2 в 1, 4, 8 и 11 день каждого 21-дневного цикла (индукционная фаза, обычно до 8 циклов), а затем в 1, 8, 11, 15 и 22 день каждого 5-недельного цикла для поддержания (Richardson P.G., N. Engl. J. Med. 2005, 352:2487).

В следующем воплощении способов изобретения данное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает винкристин и доксорубицин, а данный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон. Винкристин, например, может вводиться непрерывным IV вливанием по 0,4 мг в день (1-4 дни каждого 4-недельного цикла), а доксорубицин, например, в дозе 9 мг/м^2 в день непрерывным IV вливанием в 1-4 дни каждого 4-недельного цикла. Дексаметазон может вводиться, например, в дозе 40 мг в 1-4, 9-12 и 17-20 дни каждого 4-недельного цикла. В качестве альтернативы можно использовать пэгилированный липосомный доксорубицин (например, в дозе 40 мг/м^2 в 1-й день недельного цикла) (Rifkin, Cancer 2006, 106:848).

Другие комбинации

Комбинированная терапия по изобретению может дополнительно сочетаться с другими медикаментами, т.е. сочетаться с другими терапевтическими средствами, уместными для данного заболевания. Такое введение может быть одновременным, раздельным или последовательным. При одновременном введении эти средства могут вводиться в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, по обстоятельствам.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения заболеваний с участием экспрессирующих CD38 клеток, как описано выше, при этом способы включают тройную терапию по настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, как описано ниже.

В одном воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение по меньшей мере одного химиотерапевтического средства, по меньшей мере одного противовоспалительного средства или по меньшей мере одного иммунодепрессанта и/или иммуномодулирующего средства.

В одном воплощении такое с химиотерапевтическое редство может быть выбрано из таких антиметаболитов, как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин и подобных средств.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из таких антибиотиков, как дактиномицин (прежний актиномицин), блеомицин, даунорубицин (прежний дауномицин), идарубицин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC) и подобных средств.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из таких антимитотических средств, как таксаны, к примеру доцетаксел и паклитаксел.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из таких ингибиторов топоизомеразы, как топотекан.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из таких ингибиторов факторов роста, как ингибиторы ErbB1 (EGFR) (например, гефитиниб (Iressa®), цетуксимаб (Erbitux®), эрлотиниб (Tarceva®), 2F8 (раскрыт в WO 2002/100348) и подобные средства)), ингибиторы ErbB2 (Her2/neu) (например, трастузумаб (Herceptin®) и подобные средства)) и подобных средств. В одном воплощении таким ингибитором фактора роста может быть ингибитор фарнезилтрансферазы, как-то SCH-66336 и R115777. В другом воплощении таким ингибитором фактора роста может быть ингибитор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), как-то бевацизумаб (Avastin®).

В одном воплощении таким химиотерапевтическим средством химиотерапии может быть ингибитор тирозинкиназы, как-то иматиниб (Glivec, Gleevec STI571), лапатиниб, PTK787/ZK222584 и подобные

средства.

В одном воплощении таким химиотерапевтическим средством может быть ингибитор гистондеацетилазы. Примеры таких ингибиторов гистондеацетилазы включают такие гибридные полярные соединения на основе гидроксамовой кислоты, как SAHA (субероиланилидгидроксамовая кислота).

В одном воплощении таким химиотерапевтическим средством может быть ингибитор MAP-киназы P38a, как-то SCIO-469.

В другом воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или иной васкуляризации.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы, ингибиторы металлопротеаз матрикса (например, маримастат, неовастат, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 и подобные средства), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (например, TNP-470, сквламин, 2-метоксиэстрадиол, комбрета-статины, эндостатин, ангиостатин, пеницилламин, SCH66336 (Schering-Plough Corp., Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) и подобные средства)), антагонисты ангиогенных факторов роста (например, ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных веществ и/или их рецепторов (таких как VEGF, bFGF и ангиопоэтин-1), Sugen 5416, SU5402, антиангиогенные рибозимы (например, ангиозим), α-интерфероны (например, α2a-интерферон), сурамин и подобные средства)), ингибиторы киназы VEGF-R и другие антиангиогенные ингибиторы тирозиновых киназ (например, SU011248), ингибиторы специфичного к эндотелию интегрина/сигналов выживания (например, витаксин и подобные средства), антагонисты/хелаторы меди (например, тетратиомолибдат, каптоприл и подобные средства), карбоксиамидотриазол (CAI), ABT-627, CM101, интерлейкин-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, а также молекулы ингибирующих ангиогенез нуклеотидов (например, антисмысловая кДНК VEGF, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая p53, и кДНК, кодирующая дефектный рецептор-2 VEGF), и подобные средства.

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации и/или иной васкуляризации являются антиангиогенные производные гепарина и родственных молекул (например, гепариназы III), темозоломид, NK4, ингибирующий миграцию макрофагов фактор (MIF), ингибиторы циклооксигеназы-2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора-1, антиангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагиллин и его аналоги, аналоги соматостатина, пентозанполисульфат, текогалан натриевый, дальтепарин, тумстатин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других подходящих мишеней (например, антитела против α-5/β-3 интегрина и mAb против кининостатина) и подобные средства.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение такого противоракового иммуногена, как раковый антиген/опухолевый антиген (например, молекула адгезии эпителиальных клеток (EpCAM/TACSTD1), муцин-1 (MUC1), онкофетальный антиген (CEA), опухолевый гликопротеин 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, вакцины против связанных с раком вирусов (например, вакцины против вируса папилломы человека), белки теплового шока из опухолей и подобные средства. Целый ряд других подходящих раковых антигенов/опухолевых антигенов, описанных в настоящем изобретении, и подобных молекул, известных в данной области, также или в качестве альтернативы можно использовать в таком воплощении. Противораковые иммуногенные пептиды также включают антиидиотипические "вакцины", как-то антиидиотипические антитела BEC2, Mitumomab, CeaVac и родственные им антиидиотипические антитела, антиидиотипические антитела к антителу MG7 и другие противораковые антиидиотипические антитела (например, см. Birebent et al., Vaccine, 21(15), 1601-12 (2003); Li et al., Chin. Med. J. (Engl.), 114(9), 962-6 (2001); Schmitt et al., Hybridoma, 13(5), 389-96 (1994); Maloney et al., Hybridoma, 4(3), 191-209 (1985); Raychardhuri et al., J. Immunol. 137(5), 1743-9 (1986); Pohl et al., Int. J. Cancer, 50(6), 958-67 (1992); Bohlen et al., Cytokines Mol. Ther. 2(4), 231-8 (1996) и Maruyama, J. Immunol. Methods, 264(1-2), 121-33 (2002)). Такие антиидиотипические антитела необязательно могут быть конъюгированы с носителем, которым может быть синтетическая молекула (как правило, инертная), белок (например, гемоцианин моллюска блюдечко (KLH) (к примеру, см. Ochi et al., Eur. J. Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)) или клетки (например, эритроциты - к примеру, см. Wi et al., J. Immunol. Methods, 122(2), 227-34 (1989)).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение бифосфоната. Примерами потенциально подходящих бифосфонатов являются памидронат (Aredia®), золедроновая кислота (Zometa®), клодронат (Bonefos®), рисендронат (Actonel®), ибандронат (Boniva®), этидронат (Didronel®), алендронат (Fosamax®), тилудронат (Skelid®), инкадронат (Yamanouchi Pharmaceutical) и минодронат (YM529, Yamanouchi).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение колониестимулирующего фактора. Примерами подходящих колониестимулирующих факторов являются такие колониестимулирующие факторы гранулоцитов (G-CSF), как филграстим (Neupogen®) и пегфилграстим (Neulasta®), и такие колониестимулирующие факторы гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF), как сарграмостим (Leukine®).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение эритропоэтического средства. Примерами подходящих эритропоэтических средств являются эритропоэтин (EPO), как-то эпоэтин-α (например, Procrit®, Epogen® и Eprex®) и эпоэтин-β (например, NeoRecormon®), и стимулирующие эритропоэз белки (например, Aranesp®).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение противоракового цитокина, хемокина или их комбинации. Примеры подходящих цитокинов и факторов роста включают IFNγ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFNα (например, INFα2b), IFNβ, GM-CSF, CD40L, лиганд Flt3, фактор стволовых клеток, анцестим и TNFα. К подходящим хемокинам можно отнести Glu-Leu-Arg (ELR)-отрицательные хемокины, как-то IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1α из семейств CXC и C-C цитокинов человека. Подходящие цитокины охватывают производные цитокинов, варианты цитокинов, фрагменты цитокинов и слитые белки цитокинов.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение средства, модулирующего, например, усиливающего или ингибирующего, экспрессию или активность Fcα или Fcγ рецепторов. Примеры средств, подходящих для этого применения, включают интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), как-то филграстим (Neupogen®) и пегфилграстим (Neulasta®), и колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF), как-то сарграмостим (Leukine®), γ-интерферон (IFN-γ) и фактор некроза опухолей (TNF).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение регулятора клеточного цикла/апоптоза (или "регулирующего средства"). К регуляторам клеточного цикла/апоптоза можно отнести (i) молекулы, которые воздействуют на и модулируют такие регуляторы клеточного цикла/апоптоза, как cdc-25 (например, NSC 663284); (ii) циклинзависимые киназы, которые вызывают гиперстимуляцию клеточного цикла (например, флавопиридол (L868275, HMR1275), 7-гидроксистауроспорин (UCN-01, KW-2401) и росковитин (R-roscovitine, CYC202)); и (iii) модуляторы теломераз (например, BIBR1532, SOT-095, GRN163 и композиции, описанные, к примеру, в US 644,735 и US 6713055).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение гормонального регулирующего средства, как-то средства, применимого для антиандрогеновой и антиэстрогеновой терапии. Примерами таких гормональных регулирующих средств являются тамоксифен, идоксифен, фулвестрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстильбэстрол, этинилэстрадиол/эстинил, антиандрогены (например, флутаминд/эулексин), прогестины (например, гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерон/провера, мегестрола адепат/megace), адренокортикостероиды (например, гидрокортизон, преднизон), рилизинг-гормон лютеинизирующего гормона (и его аналоги и другие агонисты LHRH, такие как бусерелин и госерелин), ингибиторы ароматаз (например, анастразол/аримидекс, аминоглутетимид/цитраден, экземестан), ингибиторы гормонов (например, октреотид/сандостатин) и подобные средства.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение антианергического средства (например, соединений небольших молекул, белков, гликопротеидов или антител, устраняющих толерантность к опухолевым и раковым антигенам). Примерами таких соединений являются молекулы, блокирующие активность CTLA-4, как-то MDX-010 (Phan et al., PNAS USA, 100, 8372 (2003)).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего ген-супрессор опухолей, к примеру дефектного по репликации аденовируса, кодирующего рекомбинантный p53/SCH58500 дикого типа человека и т.п.; антисмысловой нуклеиновой кислоты, нацеленной на онкоген, мутировавший или подвергшийся дерегуляции ген; либо si-РНК, нацеленной на мутировавший или подвергшийся дерегуляции ген. Примеры мишеней супрессоров опухолей включают, к примеру, BRCA1, RBI, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 и DCC.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение противораковой нуклеиновой кислоты, к примеру genasense (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (инкапсулированный в липосомы антисмысловой олигонуклеотид c-raf/ISIS-5132), MG98 и другие антисмысловые нуклеиновые кислоты, нацеленные на PKCα, кластерин, IGFBPs, протеинкиназу A, циклин D1 или Bcl-2h.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение молекул противораковой ингибиторной РНК (например, см. Lin et al., Curr Cancer Drug Targets, 1(3), 241-7 (2001), Erratum in Curr Cancer Drug Targets 3(3), 237 (2003); Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004); Grzmil et al., Int. J. Oncol. 4(1), 97-105 (2004); Collis et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003); Yang et al., Oncogene, 22(36), 5694-701 (2003) и Zhang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 303(4), 1169-78 (2003)).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение вируса, вирусных белков и т.п. Дефектные по репликации вирусы, которые в общем способны на один или только несколько циклов репликации in vivo и нацелены на опухолевые клетки, к примеру, могут оказаться полезными компонентами таких композиций и способов. Такие вирусные средства могут содержать или быть связанными с нуклеиновыми кислотами, кодирующими иммуностимулянты, такие как GM-CSF и/или IL-2. Как природные, так и рекомбинантные онколитические вирусы (к примеру, вирусы HSV-1, реовирусы, дефектные по репликации и чувствительные к репликации аденовирусы и др.) могут оказаться полезными компонентами таких способов и композиций (например, см. Shah et al., J. Neurooncol. 65(3), 203-26 (2003); Stiles et al., Surgery, 134(2), 357-64 (2003); Sunarmura et al., Pancreas 28(3), 326-9 (2004); Teshigahara et al., J. Surg. Oncol. 85(1), 42-7 (2004); Varghese et al., Cancer Gene Ther. 9(12), 967-78 (2002); Wildner et al., Cancer Res. 59(2), 410-3 (1999); Yamanaka, Int. J. Oncol. 24(4), 919-23 (2004) и Zwiebel et al., Semin Oncol. 28(4), 336-43 (2001).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению может дополнительно включать методы "цельноклеточной" и "адаптивной" иммунотерапии. Например, такие методы могут включать вливание или переливание клеток иммунной системы (к примеру, инфильтрирующих опухоли лимфоцитов (TILs), как-то Т-клеток $CD4^+$ и/или $CD8^+$ (к примеру, Т-клеток, подвергнутых экспансии с помощью опухоле-специфичных антигенов и/или генетических усилителей), экспрессирующих антитела В-клеток или других продуцирующих/презентирующих антитела клеток, дендритных клеток (например, экспрессирующих антитела к цитокинам рекомбинантных дендритных клеток, дендритных клеток, культивируемых вместе с DC-экспандирующим средством, таким как GM-CSF и/или Flt3-L, и/или ассоциированных с опухолями нагруженных антигеном дендритных клеток), противоопухолевых NK-клеток, так называемых гибридных клеток или их комбинаций. Лизаты клеток тоже могут оказаться полезными в таких методах и композициях. Клеточные "вакцины" в клинических испытаниях, которые могут оказаться полезными в таких аспектах, включают клеточные лизаты Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) и Melacine®. Антигены, сброшенные с раковых клеток, и их смеси (к примеру, см. Bystryn et al., Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, July 2001), необязательно в смеси с такими адъювантами, как квасцы, также могут быть компонентами в таких методах и комбинированных композициях.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает применение метода внутренней вакцинации. Внутренняя вакцинация означает индуцирование гибели опухолевых или раковых клеток, как-то индуцированной лекарствами или облучением гибели опухолевых клеток у пациента, которая обычно ведет к выработке иммунного ответа, направленного на (i) опухолевые клетки в целом или (ii) части опухолевых клеток, включая (a) секретируемые белки, гликопротеиды или другие продукты, (b) мембраносвязанные белки или гликопротеиды либо другие компоненты, связанные с или встроенные в мембраны, и/или (c) внутриклеточные белки или другие внутриклеточные компоненты. Индуцированный внутренней вакцинацией иммунный ответ может быть гуморальным (т.е. опосредуется антителами/комплементом) или клеточным (например, при появлении и/или нарастании эндогенных цитотоксических Т-лимфоцитов, распознающих внутренне погибшие опухолевые клетки или их части).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение комплемента. Соответственно, в рамки настоящего изобретения входит применение композиций, содержащих антитела к CD38 вместе с сывороткой или комплементом. В этих композициях комплемент будет находиться в близком соседстве с антителами к CD38, к примеру, при помощи конъюгирования либо они подойдут для одновременного введения. С другой стороны, антитела к CD38 и комплемент или сыворотку можно вводить по отдельности.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение средств, вызывающих дифференцировку ретиноевой кислоты и её аналогов (например, полностью трансретиноевая кислота, 13-цис-ретиноевая кислота и подобные средства), аналогов витамина D (например, сеокальцитол и подобные средства), ингибиторов ErbB3, ErbB4, IGF-IR, инсулиновых рецепторов, PDGFRα, PDGFRβ, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 и подобных средств.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение катепсина B, модуляторов активности катепсин-D-дегидрогеназы, глютатион-S-трансферазы (например, глутацилцистеинсинтетазы и лактат-дегидрогеназы) или подобных средств.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение эстрамустина или эпирубицина.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение ингибитора HSP90 типа 17-аллиламиногельданамицина, антител против таких опухолевых антигенов, как PSA, CA125, KSA и др., интегринов типа интегрина β1, ингибиторов VCAM или подобных средств.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение ингибиторов кальцинейрина (например, вальсподар, PSC 833 и другие ингибиторы MDR-1 или р-гликопротеида), ингибиторов TOR (например, сиролимус, эверолимус и рапамицин) и ингибиторов механизмов "привлечения лимфоцитов" (например, FTY720) и таких средств, воздействующих на передачу клеточных сигналов, как ингибиторы молекул адгезии (к примеру, анти-LFA и др.).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает радиотерапию.

Радиотерапия может включать облучение или сопутствующее введение пациенту радиофармацевтических препаратов. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к подвергающемуся лечению пациенту (лучевая обработка, к примеру, может проводиться в виде внешнелучевой радиотерапии (EBRT), брахитерапии (BT) или прицельной скелетной радиотерапии). Радиоактивные элементы, которые могут использоваться при выполнении таких методов, включают, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-123, йод-131 и индий-111.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает пересадку аутологических периферических стволовых клеток или костного мозга.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает ортопедическое вмешательство.

Ортопедическое вмешательство может применяться при лечении заболеваний с участием экспрессирующих CD38 клеток, как-то множественной миеломы, чтобы лучше контролировать боль или сохранить функцию и подвижность. Такое вмешательство может включать физиотерапию, наложение шин на кости для предупреждения или лечения переломов или хирургические операции (мелкие или крупные) для заживления переломов.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение одного или нескольких средств, усиливающих проникновение антител к CD38 или комбинированной композиции внутрь опухоли. Такие методы, к примеру, могут выполняться в сочетании со введением релаксина, способного вызвать расслабление опухоли (например, см. US 6719977). В одном воплощении используемые в настоящем изобретении антитела к CD38 могут быть пришиты к проникающему в клетки пептиду (CPP). Проникающие в клетки и родственные им пептиды (например, искусственные проникающие в клетки антитела) описаны, к примеру, в Zhao et al., J. Immunol. Methods, 254(1-2), 137-45 (2001); Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000); Lindgren et al., Biochem. J. 377 (Pt 1), 69-76 (2004); Buerger et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129(12), 669-75 (2003); Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77 (1998) и Tseng et al., Mol. Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение по меньшей мере одного противовоспалительного средства.

В одном воплощении такое противовоспалительное средство может быть выбрано из стероидных препаратов и нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID).

В одном воплощении такое противовоспалительное средство может быть выбрано из аспирина и других салицилатов, ингибиторов Cox-2 (например, рофекоксиб и целекоксиб), NSAIDs (например, ибупрофен, фенопрофен, напроксен, сулиндак, диклофенак, пироксикам, кетопрофен, дифлунисал, набуметон, этодолак, оксапрозин и индометацин), антител к IL-6R, антител к IL-8 (например, 10F8, описанное в WO 2004/058797), антител к IL-15, антител к IL-15R, антител к CD4, антител к CD11a (например, эфализумаб), антител к интегрину α-4/β-1 (VLA4) (например, натализумаб), CTLA4-Ig для лечения воспалительных заболеваний, преднизолона, преднизона, таких модифицирующих заболевания антиревматических препаратов (DMARD), как метотрексат, гидроксихлорохин, сульфасалазин, ингибиторов синтеза пиримидинов (например, лефлуномид), блокаторов рецептора IL-1 (например, анакинра), блокаторов TNF-α (например, этанерцепт, инфликсимаб и адалимумаб) и подобных средств.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одного иммунодепрессанта и/или иммуномодулирующего средства.

В одном воплощении такой иммунодепрессант и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты, микофенолата мофетила, таких кортикостероидов, как преднизон, метотрексата, солей золота, сульфасалазина, противомалярийных препаратов, брехинара, лефлуномида, мизорибина, 15-дезоксипергуалина, 6-меркаптопурина, циклофосфамида, рапамицина, такролимуса (FK-506), OKT3, глобулина против тимоцитов, тимопентина, α-тимозина и подобных средств.

В одном воплощении такой иммунодепрессант и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из иммунодепрессорных антител, как-то антител, связывающихся с p75 рецептора IL-2, или антител, связывающихся, к примеру, с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFNγ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, или антител, связывающихся с их лигандами.

В одном воплощении такой иммунодепрессант и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из молекул растворимого IL-15R, IL-10, B7 (B7-1, B7-2, их вариантов и фрагментов), ICOS и OX40, ингибиторов отрицательного регулятора Т-клеток (например, антитела против CTLA4) и подобных средств.

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение антител к C3b(i).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает введение ингибиторов гистондеацетилазы (к примеру, фенилбутирата) и/или средств репарации ДНК (к примеру, ферментов репарации ДНК и родственных им композиций, как-то димерицина).

В следующем воплощении комбинированная терапия по изобретению дополнительно включает направленную противораковую фотодинамическую терапию (например, противораковую лазерную терапию, которая необязательно может осуществляться с применением фотосенсибилизирующего средства, к примеру, см. Zhang et al., J. Control. Release, 93(2), 141-50 (2003)), противораковую акустическую и ударно-волновую терапию (к примеру, см. Kambe et al., Human Cell, 10(1), 87-94 (1997)) и/или противораковую нутрацевтическую терапию (к примеру, см. Roudebush et al., Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 34(1), 249-69, viii (2004) и Rafi, Nutrition 20(1), 78-82 (2004)).

Все описанные в настоящем изобретении методы могут выполняться в любом подходящем порядке, если только не указано иначе или явно не противоречит контексту.

Все патенты, находящиеся в процессе рассмотрения патентные заявки и другие публикации, цитированные в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение путем ссылки во всей полноте.

Далее настоящее изобретение раскрывается на следующих примерах, которые не следует понимать в дополнительно ограничительном смысле.

Примеры

Пример 1. Получение трансфицированных люциферазой (Daudi-luc) клеток.

Культуры клеток Daudi (происходящих из лимфомы Беркитта) культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FCS (Optimum C241, Wisent Inc., St. Bruno, QC, Канада), 2 мМ L-глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия (все от фирмы Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Шотландия). Среду меняли два раза в неделю. Перед трансфекцией клетки разделяли на порции и высевали при 1-1,5 $\times 10^6$ клеток/мл, чтобы обеспечить жизнеспособность и оптимальный рост.

Трансфекция люциферазой.

Отбирали $8{,}2\times10^6$ клеток Daudi $CD38^+$ в 350 мкл RPMI (с добавлением 10% dFCS, Gibco BRL) и переносили в кювету для электропорации (Biorad, Hemel Hempstead, Herts, UK). Затем добавляли 40 мкг люциферазы gWIZ из GTS (Aldevron, Fargo, ND, США) и 10 мкг вектора pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, Нидерланды), придающего устойчивость к пуромицину. Клетки ставили в лед на 10 мин, а затем подвергали электропорации (250 В, 950 μФ, Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, München, Германия). Опять ставили клетки в лед, а затем вносили в 40 мл RPMI (с добавлением 10% FCS). Затем клетки высеивали на 96-луночные планшеты для культуры тканей (100 мкл на лунку). Через 48 ч добавляли пуромицин (конечная концентрация 1 мкг/мл, Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Нидерланды). Устойчивые к пуромицину клоны культивировали далее в 24-луночных планшетах для культуры тканей.

Определение люциферазной активности.

Люциферазную активность клеток определяли с помощью системы Luciferase Assay System (#E4030, Promega, Madison, WI, США). Центрифугировали 1×10^5 клеток (13500 об/мин, 1 мин) в центрифуге Eppendorf и промывали осадок в 100 мкл PBS. После центрифугирования (13500 об/мин, 1 мин) осадок подвергали лизису с помощью 20 мкл Reporter Lysis Buffer (Promega), замораживали и оттаивали. После центрифугирования (13500 об/мин, 1 мин) отбирали 20 мкл супернатанта и добавляли 100 мкл реагента для определения люциферазы (в специальных пробирках для люминометра, Promega). Измеряли люминесценцию (10 сек) на люминометре LB9507 (Berthold, Vilvoorde, Бельгия).

Пример 2. Иммунизация мышей и получение гибридом.

Методика иммунизации для -003.

Мышей HCo12 иммунизировали раз в 2 недели с помощью 20 мкг очищенного антигена HA-CD38. Первую иммунизацию проводили внутрибрюшинно в присутствии 100 мкл PBS, смешанного со 100 мкл полного адъюванта Фрейнда (CFA). После этой первой иммунизации делали повторные иммунизации (13 раз) с помощью очищенного HA-CD38 в 100 мкл PBS, смешанного со 100 мкл неполного адъюванта Фрейнда (IFA), чередуя подкожное и внутрибрюшинное введение. После появления титра мышей подвергали ревакцинации с помощью 20 мкг HA-CD38 в PBS, внутривенно.

Методика иммунизации для -005 и -024.

Мышей HCo12 иммунизировали раз в 2 недели с помощью 20 мкг очищенного антигена HA-CD38, чередуя с трансфицированными клетками NIH-3T3-CD38. Первую иммунизацию проводили внутрибрюшинно с помощью 5×10^6 клеток в 100 мкл PBS, смешанного со 100 мкл CFA, а вторую и следующую иммунизацию с помощью HA-CD38 подкожно в 100 мкл PBS, смешанного со 100 мкл IFA. Последую-

щие иммунизации с помощью трансфицированных клеток проводили в присутствии 200 мкл PBS. После появления титра мышей подвергали ревакцинации с помощью 20 мкг HA-CD38 в PBS, внутривенно.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека к CD38.

Выделяли спленоциты из мышей HCo12 и подвергали слиянию с клетками линии миеломы мыши с помощью ПЭГ по стандартным методикам. Затем полученные гибридомы подвергали скринингу на продукцию антител человека методом ELISA и на специфичность к CD38 методом FACS с помощью трансфицированных CD38 клеток NS/0 человека и на связывание с рекомбинантным белком HA-CD38 методом ELISA. Были отобраны три линии клеток гибридомы, экспрессирующих моноклональные антитела человека к CD38 -003, -005 и -024 соответственно.

Пример 3. Трансфекция клеток NIH с помощью CD38.

Вектор (pcIpuroCD38) для получения клеток NIH-3T3-CD38 был получен от проф. M. Glennie (Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK). Клетки NIH-3T3 (DSMZ, ACC 59; 150000 клеток/лунку; 0,5 мл; 96-луночные плоскодонные планшеты, Greiner) культивировали в среде DMEM (с добавлением глюкозы [4,5 г/л], 10% FCS, L-глутамина, Na-пирувата; BioWhittaker) в течение 24 ч. Затем разбавляли ДНК (0,8 мкг) и липофектамин (Invitrogen, Breda, Нидерланды) в DMEM и перемешивали (20 мин, комн. темп.). После этого смесь (100 мкл) вносили во все лунки и инкубировали (в течение ночи, 37°C).

Скрининг на экспрессию CD38.

Клетки NIH-3T3-CD38 промывали (в 1 мл PBS) и обрабатывали трипсином (200 мкл, трипсин-ЭДТА, BioWhittaker). Затем добавляли 1 мл DMEM и раскапывали смесь в пробирки для FACS. После центрифугирования (1200 об/мин, 5 мин) клетки промывали в буфере FACS (FB; PBS, 0,05% BSA, 0,02% NaN_3) и ресуспендировали в 1 мл FB. После центрифугирования (1200 об/мин, 5 мин) удаляли супернатант и добавляли мышиное антитело против CD38-PE человека (разведение 1:50, Sanquin, Amsterdam, Нидерланды). После отмывки клеток два раза буфером FB их ресуспендировали в FB для регистрации методом проточной цитометрии.

Размножение и селекция.

После обработки трипсином клетки переносили в колбы T25 (Greiner) в DMEM (с добавлением глюкозы 4,5 г/л, 2 мМ L-глутамина и пуромицина (2 мкг/мл) BioWhittaker). Устойчивые к пуромицину клетки проверяли на стабильную экспрессию CD38 методом проточной цитометрии после 2 недель на содержащей пуромицин среде. Отобранные клетки NIH-3T3-CD38 субклонировали методом предельного разведения. После размножения этих клеток все 15 клонов NIH-3T3-CD38 подвергали скринингу на экспрессию CD38. Клетки NIH-3T3-CD38 CD38high замораживали в жидком азоте (-80°C) до использования.

Культивирование клеток NIH-3T3-CD38.

Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением глюкозы (4.5 г/л), 10% FCS, 2 мМ L-глутамина, Na-пирувата, пенициллина, стрептомицина. Клетки пересеивали два раза в неделю с использованием трипсина/ЭДТА и высеивали в концентрации 1×10^6 клеток на колбу T75. Клетки NIH-3T3-CD38 CD38high замораживали в жидком азоте (-80°C) до использования.

Очистка антигена HA-CD38.

Конъюгировали сефарозу 4B (Amersham Bioscience, Uppsala, Швеция) с антителом к CD38 (Serotec, Oxford, UK). Уравновешивали колонку (корпус колонки HR5/20 набивали до высоты 12 см, колоночный объем 2,4 мл; скорость протока 0,5 мл/мин) по меньшей мере в пяти колоночных объемах (CV) PBS. Фильтровали образец и наносили на колонку. Колонку промывали PBS до тех пор, пока сигнал не вернется к исходному уровню (примерно 3 CV). Элюирование проводили с помощью 0,1 М глицина при pH 2. Выходящие фракции нейтрализировали с помощью 1% (v/v) 2 М трис-HCl, pH 9.

Очистка антител к CD38.

Антитела человека к CD38 выделяли из супернатантов тканевых культур. Сначала супернатанты фильтровали через заглушённый фильтр на 0,20 мкМ. Затем супернатант наносили на колонку с белком A объемом 5 мл (rProtein A FF, Amersham Bioscience) и элюировали с помощью 0,1 М смеси лимонная кислота-NaOH, pH 3. Элюат сразу же нейтрализировали с помощью 2 М трис-HCl, pH 9 и диализировали в течение ночи против 12.6 мМ фосфата натрия, 140 мМ NaCl, pH 7.4 (B. Braun, Oss, Нидерланды). После диализа образцы стерилизировали фильтрованием через заглушённый фильтр на 0,20 мкМ.

Очистка партий His-CD38.

Белок находится в супернатанте культуры клеток, экспрессирующих His-CD38 с помощью ДНК-конструкции, содержащей последовательность для внеклеточного домена CD38. В конструкцию дополнительно встроена последовательность метки poly-His, которая находится на N-конце белка. Эта метка позволяет проводить очистку методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. В этом способе хелатор, фиксированный на хроматографической смоле, заполняется катионами Co^{2+}. В частности, последовательность, содержащая 6 аминокислот гистидина, сильно связывает Co^{2+}.

Поэтому белки CD38 с His-меткой прочно связываются на такой колонке, тогда как другие белки, присутствующие в супернатанте культуры, проходят через колонку или вымываются из нее. Затем прочно связанные белки CD38 с His-меткой элюируются с помощью буфера, содержащего имидазол, который

конкурирует с His за связывание Co^{2+}. После очистки достаточного количества His-CD38 элюент удаляют из белка при замене буфера на обессоливающей колонке.

Пример 4. Связывание антител -003, -005 и -024 с трансфицированными CD38 клетками CHO (CHO-CD38), клетками Daudi-luc и свежими опухолевыми клетками множественной миеломы (MM).

После выделения и подсчета клетки Daudi-luc, клетки CHO, трансфицированные CD38, и контрольные клетки CHO ресуспендировали в PBS (1×10^6 клеток/мл). Затем клетки наносили на 96-луночные планшеты с V-образным дном (100 мкл на лунку) и дважды промывали PBS-BSA (PBS с добавлением 0,1% BSA и 0,02% Na-азида). После этого к клеткам добавляли 50 мкл раствора антитела в PBS-BSA (4°C, 30 мин). После отмывки три раза в PBS-BSA добавляли 50 мкл (разведение 1:4000) меченного FITC кроличьего антитела к IgG человека в PBS-BSA (4°C в темноте, 30 мин). Клетки отмывали три раза и детектировали специфическое связывание антител к CD38 с клетками CHO-CD38 и Daudi-luc методом проточной цитометрии. В качестве контроля использовали HuMab-KLH (моноклональное антитело человека против KLH (гемоцианина моллюска блюдечко), полученное на фирме Genmab B.V., Utrecht, Нидерланды, по методикам иммунизации, описанным далее в настоящем изобретении)). Из фиг. 1 и 2 видно, что антитела -003, -005 и -024 связываются и с клетками CHO-CD38 и с клетками Daudi-luc, хотя и с различными значениями EC_{50} (табл. 1). Связывания с контрольными клетками CHO не наблюдалось (данные не приводятся).

Свежие опухолевые клетки MM получали от д-ра Lokhorst (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Нидерланды). Опухолевые клетки выделяли из костного мозга больных множественной миеломой методом центрифугирования в градиенте фиколла (BioWhittaker; среда выделения лимфоцитов, кат. № 17-829E). После выделения и подсчета клетки MM (100000 клеток/лунку) ресуспендировали в 25 мкл меченных FITC специфичных к CD38 антител и 25 мкл CD138. После инкубации (4°C, 30 мин) клетки отмывали в PBS-BSA и добавляли меченные PE козьи антитела к IgG мыши (1:200; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Soham, UK). После инкубации (4°C, 30 мин) и отмывки клеток в PBS-BSA измеряли флуоресценцию методом проточной цитометрии.

Из фиг. 3 видно, что антитела -003, -005 и -024 связываются с клетками MM.

Таблица 1

Значения EC_{50} для связывания антител к CD38 с клетками CHO-CD38, клетками Daudi-luc и свежими опухолевыми клетками MM

Специфичное к CD38 антитело	**EC_{50} для CHO-CD38 (мкг/мл)**	**EC_{50} для Daudi-luc (мкг/мл)**	**EC_{50} для клеток MM (мкг/мл)**
-003	0,54	0,26	0,56
-005	0,23	0,09	0,04
-024	0,08	0,05	0,02

Пример 5. Антителозависимая клеточная цитотоксичность.

Клетки Daudi-luc, свежие опухолевые клетки множественной миеломы, свежие опухолевые клетки плазмоцитарной лейкемии и клетки множественной миеломы JK6L и AMO-1 вносили (5×10^6 клеток) в $RPMI^{++}$ (культуральная среда RPMI 1640 с добавлением 10% космидной телячьей сыворотки (HyClone, Logan, UT, США)), в которую добавлено 100 мкКи ^{51}Cr (хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Нидерланды), и инкубировали смесь на водяной бане при 37°C в течение 1 ч. После отмывки (два раза в PBS, 1500 об/мин, 5 мин) клетки ресуспендировали в $RPMI^{++}$ и подсчитывали методом исключения трипана синего. Клетки доводили до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

Получение эффекторных клеток.

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (здоровые добровольцы, UMC Utrecht, Utrecht, Нидерланды) выделяли из 40 мл гепаринизованной крови с помощью фиколла (BioWhittaker; среда выделения лимфоцитов, кат. № 17-829E) согласно инструкциям изготовителя. После ресуспендирования в среде $RPMI^{++}$ клетки подсчитывали методом исключения трипана синего и доводили до концентрации 1×10^7 клеток/мл.

Условия ADCC.

В 96-луночные планшеты вносили 50 мкл ^{51}Cr-меченых клеток-мишеней и добавляли 50 мкл антител, разведенных в $RPMI^{++}$ (конечные концентрации 10, 1, 0,1, 0,01 мкг/мл). Клетки инкубировали (комн. темп., 15 мин) и добавляли 50 мкл эффекторных клеток, получая соотношение эффектор/мишень = 100:1 (для определения максимального лизиса вместо эффекторных клеток добавляли 100 мкл 5% Triton-X100; для определения спонтанного лизиса использовали 50 мкл клеток-мишеней и 100 мкл $RPMI^{++}$). Клетки центрифугировали (500 об/мин, 5 мин) и инкубировали (37°C, 5% CO_2, 4 ч). После осаждения клеток (1500 об/мин, 5 мин) отбирали 100 мкл супернатанта в микропробирки и просчитывали на гамма-счетчике. Специфический лизис в процентах рассчитывали следующим образом:

(имп./мин. образца – имп./мин. одних только клеток-мишеней)/(имп./мин. максимального лизиса – имп./мин. одних только клеток-мишеней),

где имп./мин означает количество импульсов в минуту.

У клеток Daudi-luc (фиг. 4 и табл. 2) антитела -003, -005 и -024 вызывают лизис посредством ADCC, причем -003 и -005 действуют несколько лучше, чем ритуксимаб (mAb против CD20). Интересно, что при использовании в качестве клеток-мишеней свежих опухолевых клеток множественной миеломы (полученных от д-ра H. Lokhorst, UMCU, Нидерланды) антитела -003, -005 и -024 тоже вызывают ADCC.

Таблица 2

Значения EC_{50} у специфичных к CD38 антител при ADCC

Специфичное к CD38 антитело	**EC_{50} для Daudi-luc (нг/мл)**	**EC_{50} для клеток MM (нг/мл)**
-003	9,0	27
-005	4,5	5,7
-024	9,7	56

Обогащение мононуклеарных клеток периферической крови Erlangen.

Кровь человека от добровольцев (Университет Erlangen, Erlangen, Германия) разбавляли в два раза средой RPMI 1640 и клетки крови наслаивали на фиколл (среда выделения лимфоцитов 1077 г/мл, 710 г, комн. темп., 20 мин; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgium, кат. № 17-829E, серия № 0148 32). Мононуклеары периферической крови (MNC) собирали из интерфазы, промывали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FCS, 2 мМ L-глутамина, 5 Е/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (все от фирмы BioWhittaker), в которую добавляли 25 мМ HEPES (BioWhittaker).

Условия ADCC II.

В-клетки мишени (свежие опухолевые клетки плазмоцитарной лейкемии, В-клетки линий JK6L и AMO-1, полученные от д-ра T. Valerius, Университет Эрлангена, Erlangen, Германия) метили с помощью 20 мкКи ^{51}Cr (Amersham Biosciences, Uppsala, Швеция) в течение 2 ч. После исчерпывающей промывки средой RPMI-10 клетки доводили до 1×10^5 клеток/мл. В круглодонные лунки планшета (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Германия) вносили MNC (50 мкл, сенсибилизирующие антитела (50 мкл) и RPMI-10 (50 мкл). Определение запускали добавлением свежих опухолевых клеток плазмоцитарной лейкемии, клеток JK6L или AMO-1 (50 мкл), что дает конечный объем в 200 мкл. Использовали соотношение эффектор/мишень (E:T) = 40:1. После инкубации (3 ч, 37°C) определение останавливали центрифугированием и измеряли высвобождение ^{51}Cr из тройных проб в импульсах за 1 мин (имп./мин.) на сцинтилляционном счетчике.

Клеточную цитотоксичность в процентах рассчитывали по следующей формуле:

специфический лизис в % = (экспериментальные имп./мин. – базальные имп./мин.)/(максимальные имп./мин. – базальные имп./мин.)×100,

при этом максимальное высвобождение ^{51}Cr определяли при добавлении хлорной кислоты (конечная концентрация 3%) к клеткам мишени, а базальное высвобождение измеряли в отсутствие сенсибилизирующих антител и эффекторных клеток.

В обеих линиях клеток множественной миеломы (т.е. JK6L и AMO-1) оба антитела -003 и -005 вызывали лизис (фиг. 5 и 7) даже при слабой экспрессии CD38 (линия клеток AMO-1). Антитела -003, -005 и -024 индуцировали ADCC у первичных опухолевых клеток плазмоцитарной лейкемии (фиг. 5B).

Пример 6. Комплементзависимая цитотоксичность.

После выделения и подсчета клеток Daudi-luc их жизнеспособность должна составлять ≥90%. После промывки (PBS) клетки ресуспендировали при $2{,}0\times10^6$ клеток/мл в RPMI-B (среда RPMI с добавлением 1% BSA). После этого клетки вносили в лунки круглодонного 96-луночного планшета при 1×10^5 клеток/лунку. Затем добавляли в лунки 50 мкл антител (конечная концентрация в пределах 0-100 мкг/мл, разведение в 3 раза средой RPMI-B). После инкубации (комн. темп., 15 мин) в каждую лунку добавляли 11 мкл сборной сыворотки человека (пул от 18 здоровых доноров) (37°C, 45 мин). Лунки ресуспендировали один раз и переносили 120 мкл в пробирки для FACS (Greiner). Затем в эту суспензию добавляли 10 мкл пропидия йодида (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.) (раствор 10 мкг/мл). Лизис детектировали методом проточной цитометрии (FACScalibur™, Becton Dickinson, San Diego, CA, США), измеряя процентное содержание мертвых клеток (которые соответствуют PI-положительным клеткам).

Из фиг. 8 и табл. 3 видно, что антитело -005 вызывает лизис клеток Daudi-luc (~60% от максимального лизиса), а антитело -003 вызывает лизис только при очень высоких концентрациях антитела. Антитело -024 не вызывает CDC на клетках Daudi (данные не приводятся). На клетках CHO-CD38 лизис вызывают все антитела -003, -005 и -024 (фиг. 9 и табл. 3). Антитело -003 вызывает лизис при более высоких концентрациях. На опухолевых клетках (все они получены от д-ра Lokhorst и д-ра Bloem, University Medical Center Utrecht, Нидерланды), полученных от других больных MM (A: 3% рефрактерных раковых клеток, B: 9% рефрактерных раковых клеток, C: 30-40% раковых клеток и D: 70% раковых клеток), лизис посредством CDC наблюдается в присутствии антитела -005, но не в присутствии -003 (фиг. 10). Антитело -024 также вызывало лизис опухолевых клеток MM (фиг. 10E).

Таблица 3

Значения EC_{50} у специфичных к CD38 антител при CDC

Специфичное к CD38 антитело	EC_{50} для Daudi-luc (мкг/мл)	EC_{50} для клеток MM (мкг/мл)
-003	>90	3,14
-005	0,33	0,14
-024	>90	0,24

Пример 7. Исследование перекрестной блокировки методом FACS.

Клетки CHO-CD38 инкубировали с избытком немеченых специфичных к CD38 антител (4°C, 15 мин). Затем клетки инкубировали с меченными FITC специфичными к CD38 антителами (концентрация приблизительно равна EC_{90}, 4°C, 45 мин). После отмывки клеток два раза с помощью PBS-BSA измеряли флуоресценцию методом проточной цитометрии. Из фиг. 11 видно, что немеченное антитело -003 блокирует связывание меченного FITC антитела -003, тогда как связывание меченного FITC антитела -005 не блокируется. К тому же немеченое антитело -005 блокирует связывание меченного FITC антитела -005, тогда как связывание меченного FITC антитела -003 не блокируется. Антитела -003 и -005 связываются с различными эпитопами, так как они не конкурируют за связывание.

Пример 8. Исследование перекрестной блокировки методом ELISA.

Растворимый CD38 человека фиксируют на поверхности планшета для ELISA. Фиксированный CD38 инкубируют с избытком немеченых специфичных к CD38 антител в течение примерно 15 мин, после чего добавляют биотинилированные специфичные к CD38 антитела (концентрация приблизительно равна EC_{90}, комн. темп., 1 ч). После отмывки три раза с помощью PBS/Tween добавляют конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидин и инкубируют смесь 1 ч при комн. темп. Комплекс можно детектировать при добавлении раствора ABTS и измерении превращения субстрата под действием HRP на считывающем устройстве для ELISA по значениям OD при 405 нм.

Пример 9. Исследование перекрестной блокировки методом сэндвич-ELISA.

Специфичные к CD38 антитела фиксируют на поверхности планшета для ELISA. Фиксированные на планшете антитела инкубируют с биотинилированным растворимым CD38 при избытке специфичных к CD38 антител в жидкой фазе. После отмывки с помощью PBS/Tween связавшийся биотинилированный CD38 проявляют с помощью конъюгированного с HRP стрептавидина в течение 1 ч при комн. темп. Этот комплекс можно детектировать при добавлении раствора ABTS (после отмывки с помощью PBS/Tween) и измерении превращения субстрата под действием HRP на считывающем устройстве для ELISA по значениям OD при 405 нм.

Пример 10. Реактивность с комплектом тканей человека и перекрестная реактивность с тканями мартышки методами иммуногистохимии.

Делали срезы замороженных тканей человека (полученные от д-ра H. Niessen, Free University Medical Center, Amsterdam, Нидерланды) или тканей обезьяны (Inveresk Research, Glasgow, Шотландия) толщиной 6 мкм и сушили воздухом в течение ночи. Эти срезы из криостата фиксировали в ацетоне (комн. темп., 10 мин) и сушили воздухом (около 5 мин). После этого срезы инкубировали в 1-кратном цитратном/фосфатном буфере, содержащем 0,1% H_2O_2 (pH 5.8; Sigma) для блокирования эндогенной перок-сидазы. Через 20 мин при комнатной температуре срезы дважды промывали PBS и 0.05% Tween-20 (PBST, комн.темп., 5 мин; Riedel de-Haen, Германия). Затем срезы инкубировали с авидином (комн. темп., 15 мин; DAKO, Glostrup, Дания), дважды промывали PBST и инкубировали с биотином (комн. темп., 15 мин; DAKO) для блокирования эндогенного биотина. После двукратной отмывки PBST срезы преинкубировали с $PBST^{++}$ (PBST с добавлением 10% нормальной сыворотки человека (NHS, CLB, Amsterdam, Нидерланды) и 10% нормальной козьей сыворотки (NGS; DAKO) (комн. темп., 20 мин). После удаления преинкубационной сыворотки срезы инкубировали с меченными FITC первичными антителами, разведенными 2% $PBST^{++}$ до указанных концентраций (комн. темп., 60 мин). После этого срезы инкубировали с кроличьим антителом к FITC (1:1000; DAKO) в 2% $PBST^{++}$ (комн. темп., 30 мин). После отмывки срезов PBST их инкубировали с козьим антителом против биотина кролика (1:400; DAKO) в 2% $PBST^{++}$ (комн. темп., 30 мин). Затем срезы отмывали и инкубировали с SABC-HRP (1:100; DAKO) в 2% $PBST^{++}$ (комн. темп., 30 мин). После двукратной отмывки PBST срезы инкубировали (комн. темп., 10 мин) с содержащим аминоэтилкарбазол (AEC) раствором проявителя (50 мМ ацетатный буфер, pH 4,9, 0,01% H_2O_2; Riedel-de-Haen). Наконец, срезы промывали водой Millipore (5 мин) и подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином (DAKO). С помощью глицергеля срезы накрывали покровными стеклами и исследовали методом световой микроскопии (Axiovision-2; Zeiss, Thornwood, NY, США).

Бронхиальный эпителий окрашивается антителами -003 и -005 (фиг. 12B и 13B), как и поперечно-полосатые мышцы (миоциты, фиг. 12C и 13C), макрофаги, лимфоциты и плазматические B-клетки (фиг. 12A и 13A). Антитело -024 тоже окрашивает поперечно-полосатые мышцы и бронхиальный эпителий, но с меньшей интенсивностью. Не наблюдается окрашивания эндотелиальных клеток ни антителом -003 (фиг. 14D), -005 (14E), ни антителом -024 (данные не приводятся), тогда как наблюдается четкое окрашивание антителами положительного контроля против маркеров эндотелиальных клеток CD31 (фиг. 14A) и vWF (14B). В качестве отрицательного контроля использовали антитело против KLH

(фиг. 14C). Антитела -003 (фиг. 12D) и -024 (данные не приводятся), но не -005 (фиг. 13D) дают перекрестную реакцию с лимфоидной тканью мартышки.

Пример 11. Перекрестная реактивность с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) мартышки или макаки резус методом проточной цитометрии.

Подвергали лизису 5 мл периферической крови мартышки (Inveresk Research) добавлением 4,5 мл шок-буфера (1,7 мМ NH_4Cl, 1 мМ ЭДТА), 40 мл H_2O и 450 мкл 10% $KHCO_3$. После гемолиза клетки центрифугировали (1200 об/мин, 10 мин) и дважды промывали PBS. После подсчета клеток с помощью трипана синего их ресуспендировали в PBS-BSA (1×10^6 клеток/мл).

Разбавляли 17,5 мл периферической крови макаки резус (BPRC, Rijswijk, Нидерланды) 1:1 средой RPMI 1640 и наслаивали на фиколл (1,077 г/мл; BioWhittaker, кат. № 17-829E, серия № 0148 32). После центрифугирования (710 g, комн. темп., 20 мин) собирали интерфазу и дважды промывали средой RPMI. После последней промывки клетки ресуспендировали в RPMI 1640 при концентрации 1×10^5 клеток/50 мкл.

Клетки переносили на 96-луночный планшет (100 000 PBMC на лунку), промывали буфером для FACS (PBS, 0.05% BSA, 0.02% NaN_3) и инкубировали с первичными антителами (4°C, 30 мин). После отмывки в PBS-BSA добавляли 50 мкл меченных FITC кроличьих антител против IgG человека (DAKO, Glostrup, Дания) (4°C, 30 мин). Наконец, клетки собирали в пробирки для FACS в общем объеме 150 мкл. Образцы измеряли и анализировали на приборе FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Diego, CA, США).

Методом проточной цитометрии на лимфоцитах (фиг. 15A) и моноцитах (фиг. 15B) мартышки была установлена перекрестная реактивность антитела -003, но не антитела -005. Также и у макаки резус на мононуклеарах наблюдалась перекрестная реактивность антитела -003, но не антитела -005 (фиг. 15C).

Пример 12. Эксперименты по интернализации.

Клетки CHO-CD38 окрашивали при насыщающей концентрации меченных FITC специфичных к CD38 антител (на льду, 30 мин). После отмывки клеток (средой RPMI 1640 с добавлением 10% FCS) один пул клеток нагревали до 37°C для запуска интернализации, а другой пул оставляли на льду. Через определенные промежутки времени (0-120 мин) отбирали порции клеток и переносили в ледяной PBS-BSA, чтобы остановить интернализацию. После двукратной отмывки образцов PBS-BSA в них добавляли EtBr (разбавленный PBS-BSA, конечная концентрация 2 мг/мл), чтобы погасить флуоресценцию мембраносвязанного FITC. Флуоресценцию измеряли методом проточной цитометрии.

Из фиг. 16A и 16B видно, что антитела -003 и -005 интернализируются клетками CHO-CD38 в течение 5 мин при 37°C.

Пример 13. Эксперименты с SCID-люциферазой in vivo.

На этой модели опухолевые клетки подвергаются трансфекции люциферазой светлячков. При введении мышам люциферина (Molecular Probes, Leiden, Нидерланды) меченые клетки можно детектировать in vivo методом биолюминесцентной интраскопии с помощью высокочувствительной ПЗС-видеокамеры, см. Wetterwald et al., American Journal of Pathology, 160(3), 1143-1153 (2002).

Клетки Daudi трансфицировали люциферазой gWIZ фирмы Gene Therapy Systems (San Diego, CA) и культивировали в среде RPMI с 10% FCS, Pen/Strep, пируватом натрия и 1 мкг/мл пуромицина (Sigma). Клетки подвергали анализу на экспрессию люциферазы (выражали в отн. ед. люминесценции (RLU) на 1×10^5 клеток) на люминометре и на экспрессию CD38 методом FACS. Мышам SCID внутривенно вводили по $2{,}5\times10^6$ клеток Daudi, трансфицированных люциферазой. Мышей обрабатывали антителом -003, -005, контрольным антителом того же изотипа (HuMab-KLH) или ритуксимаб (антителом к CD20). Антитела вводили внутрибрюшинно. Использовали 4 схемы обработки (см. табл. 4). По профилактической схеме антитела (100 мкг/мышь) и клетки вводили одновременно. По терапевтической схеме I антитела (300 мкг/мышь) вводили через 7 дней после введения клеток. По терапевтической схеме II антитела (10 мкг/мышь) вводили через 14 дней после введения клеток. По терапевтической схеме III антитела (100 мкг/мышь) вводили через 7 дней после введения клеток. Для интраскопии мышей анестезировали введением внутрибрюшинно смеси кетамин/ксилазин/атропин. Синтетический D-люциферин (натриевая соль, Molecular Probes) вводили внутрибрюшинно в дозе 25 мг/мл. После этого мышей помещали в светонепроницаемую камеру и через 3 мин начинали интраскопию при помощи охлаждаемого жидким азотом CCD-детектора VersArray 1300B (Roper Scientific). Излучаемые из люциферазы фотоны регистрировали на протяжении 5 мин. При освещении делали черно-белые изображения для контроля. Для сбора данных и анализа изображений использовали программное обеспечение MetaVue (Universal Imaging Corp). Статистическую значимость отличий между группами устанавливали методом одностороннего дисперсионного анализа по критерию повторной проверки Newman-Keuls с помощью программы GraphPad PRISM версии 3.02 (Graphpad Software Inc).

Таблица 4

Схемы обработки для экспериментов с люциферазой in vivo

Схема эксперимента	Обработка антителом (день после введения клеток)	Доза антитела (мкг/мышь)
Профилактическая	0	100
Терапевтическая I	7	300
Терапевтическая II	14	10
Терапевтическая III	7	100

Из фиг. 17A и 17B видно, что антитела -003 и -005 ингибируют рост опухолевых клеток по профилактической схеме и терапевтической схеме I, подобно ингибированию, наблюдавшемуся для антитела к CD20. Оба антитела действовали значительно лучше, чем контрольное антитело того же изотипа. По терапевтической схеме II антитела к CD38 также замедляют рост опухолевых клеток Daudi-luc (фиг. 17C). По терапевтической схеме III антитела -003 и -024 проявляют четкое ингибирование роста опухолевых клеток Daudi-luc (фиг. 17D).

Пример 14. Апоптоз.

Анализ апопотоза проводили согласно инструкциям производителя (Annexin-V Apoptosis kit, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Нидерланды). Вкратце, к $2,5\times10^5$ клеток (трансфицированных люциферазой клеток Daudi в 0,5 мл $RPMI^{++}$ на 24-луночном планшете) добавляли mAb к CD38 в концентрации 5 мкг/мл антител -003 или -005 или антител к CD20, одних или в присутствии перекрестно-блокирующих кроличьих антител против IgG человека (50 мкг/мл).

После инкубации (37°C, 5% CO_2, 20 ч) клетки тщательно собирали и отмывали буфером для связывания (1200 об/мин, 4°C, 5 мин, BD Biosciences). Осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера для связывания. Затем в суспензию добавляли 5 мкл Annexin-V-FITC (BD Biosciences) и 10 мкл PI (BD Biosciences) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл буфера для связывания и измеряли образцы (сигналы PI в режиме FL2). Для анализа апоптозных клеток подсчитывали все Annexin-V-положительные клетки методом проточной цитометрии на проточном цитометре FACScalibur с программой CellQuest pro (BD Biosciences). Для анализа регистрировали по меньшей мере 10000 событий. Эта популяция включает как PI-положительные, так и PI-отрицательные клетки.

Из фиг. 18 видно, что антитела -003 и -005 не индуцируют апоптоз. Однако после сшивания наблюдается апоптоз клеток мишени. Антитело -003 после сшивания индуцировало апоптоз, подобный апоптозу, индуцированному антителом к CD20 (ритуксимаб). Антитело -005 обладало меньшей способностью к индуцированию апоптоза после сшивания. Аналогичные результаты были получены с клетками RAMOS в качестве мишени (данные не приводятся).

Пример 15. Эффект антитела -005 на трансплантат B-клеток на модели мышей RA-SCID.

Имплантирование синовиальной ткани.

Мышей SCID линии C.B.-17IcrCrl-SCID-bg, самцов/самок, 4-12-недельных, приобретенных у фирмы Charles River Laboratories Nederland (Maastricht, Нидерланды), содержали в клетках IVC при стандартных условиях температуры и освещения и давали лабораторный корм и воду ad libitum. Перед имплантированием (по три мыши в каждой экспериментальной группе, день 0) мышей анестезировали внутрибрюшинным введением кетамина (NIMATEK, EuroVet) и ксилазина (Rompun, Bayer) в соотношении 1:1. Делали небольшой надрез кожи с помощью хирургических ножниц. Воспаленную синовиальную ткань от больного ревматоидным артритом, подвергающегося операции по замене сустава, имплантировали подкожно в виде кластера из шести небольших фрагментов (всего 2-3 $мм^3$) в каждый бок мыши. Ранку замыкали с помощью цианоакрилатного клея Permacol. В 1-й день эксперимента остаток синовиальной ткани подвергали анализу для проверки на B-клетки в воспаленных синовиальных трансплантатах. Антитело -005 (12 мг/кг) или контрольное антитело (против KLH, 30 мг/кг) вводили внутривенно в объеме 200 мкл на 8 день эксперимента. По окончании эксперимента (14 день) мышей забивали путем ингаляции CO_2 и извлекали синовиальные трансплантаты. Один из трансплантатов мгновенно замораживали в соединении OCT (TissueTek, Sacura Finetek Europe) для дальнейшего иммуногистохимического анализа, а другой замораживали погружением в жидкий азот для дальнейшего анализа РНК.

Иммуногистохимия.

Делали криосрезы толщиной 5 мкм на предметных стеклах SuperFrost (Menzel GmbH, Braunschweig) при помощи криостата LEICA CM1900 и хранили при -80°C. Оттаявшие срезы фиксировали ацетоном в течение 10 мин, сушили при комнатной температуре и промывали PBS 3×5 мин. Все операции выполнялись при комнатной температуре. Эндогенную пероксидазную активность блокировали при инкубации в PBS с добавлением 0,3% перекиси водорода и 0,1% азида натрия в течение 20 мин. Стекла промывали PBS 3×5 мин и инкубировали с 10% нормальной сывороткой человека (NHS)/10% нормальной сывороткой кролика (NRbS) в PBS/1% BSA в течение 30 мин. Затем инкубировали с первичным антителом (mAb мыши), разведенным PBS с добавлением 1% BSA/10% NHS/10% NRbS в течение 60 мин. После отмывки PBS 3×2 мин добавляли HRP-конъюгат (козье антитело к Ig мыши с HRP; DAKO P0447), разведенный 1:50 в PBS (с добавлением 1% BSA/10% NHS/10% NRbS) на 30 мин. Сигнал пероксидазы усиливали с

помощью системы TSA™ Biotin (Perkin Elmer Life Sciences, NEL700). Стекла отмывали PBS 3×2 мин и инкубировали с биотинилтирамидом, разведенным 1:1600 в амплификационном буфере в течение 30 мин. После отмывки PBS 3×2 мин добавляли HRP-стрептавидин, разведенный 1:400 в PBS (с добавлением 1% BSA) на 30 мин. Стекла отмывали PBS 3×2 мин и инкубировали с раствором DAB (DAKO Cytomation K3465) в течение 5 мин. Цветную реакцию останавливали дистиллированной водой. Наконец, стекла подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином (Merck), промывали водопроводной водой и накрывали покровными стеклами с помощью глицерина Кайзера.

Оценка интенсивности окрашивания.

Оценка окрашивания трансплантатов синовиальной ткани проводилась слепым методом двумя специалистами. Сначала выбирали самый интенсивный срез из серии срезов и этому эталонному срезу присваивали максимальное число баллов 8. Затем оценивали интенсивность окрашивания других срезов по шкале от 0 до 8 относительно эталонного среза.

Статистический анализ.

Балльные оценки интенсивности окрашивания анализировали методом ANOVA с односторонним критерием Kruskal-Wallis, а затем по критерию Dunn для множественных сравнений с помощью GraphPad Prism версии 4.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, США).

Из фиг. 19 и 21 видно, что количество анти-CD38-положительных плазмоцитов уменьшается после обработки антителом -005. Окрашивание плазмоцитов с помощью антитела к CD138 подтверждает, что антитело -005 приводит к уменьшению числа плазмоцитов (фиг. 20 и 22).

Пример 16. Секвенирование кодирующей последовательности антител человека к CD38.

Выделение РНК.

Тотальную РНК выделяли из 51×10^6 клеток линий гибридомы, экспрессирующих моноклональные антитела -003, -005 и -024 соответственно, с помощью набора RNeasy kit (Qiagen, Westburg, Leusden, Нидерланды) согласно методике изготовителя.

Получение кДНК антител -003, -005 и -024.

Комплементарную ДНК (кДНК) из РНК методом 5'-RACE выделяли из 100 нг тотальной РНК с помощью набора SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech), следуя методике изготовителя.

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали и количественно определяли на фирме Isogen Bioscience (Maarssen, Нидерланды). Праймеры растворяли в H_2O до 100 пмоль/мкл и хранили при -20°C. Данные по всем праймерам для ПЦР и секвенирования сведены в табл. 5. Для ПЦР использовали ДНК-полимеразу PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Amsterdam, Нидерланды; номер продукта 600322) согласно инструкциям изготовителя. Каждая реакционная смесь содержала смесь 200 мкМ dNTP (Roche Diagnostics, Almere, Нидерланды; номер продукта 1814362), 12 пмоль обратного праймера (RACEG1A1 для V_H3003-005, RACEV_HApaI для V_H3003-003 и RACEVLBsiWI для V_L3003-003 и -005), 7,2 пмоль смеси UPM (UPM-Mix: 2 мкМ ShortUPMH3 и 0,4 мкМ LongUPMH_3), 0,6 мкл кДНК матрицы для 5'RACE и 1,5 ед. ДНК-полимеразы PfuTurbo® Hotstart в буфере для реакции ПЦР (поставляется вместе с полимеразой) в общем объеме 30 мкл. Реакции ПЦР проводили в термоциклере TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Германия; номер продукта 050-801), используя программу из 35 циклов: денатурация при 95°C в течение 2 мин; 35 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1,5 мин при 72°C; заключительное наращивание при 72°C в течение 10 мин. При необходимости смеси для ПЦР хранили при 4°C до дальнейшего анализа или обработки.

Таблица 5

Праймеры

Наименование	Последовательность
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
RACEV$_L$BsiWi	GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG
RACEV$_H$ApaI	GGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTT
RACEG1A1	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
M13reverse	GGATAACAATTTCACACAGG
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA TCAACGCAGAGT
HCseq5	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
VH3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCTC
VH3003-5for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT
VL3003-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC
VL3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTG
VH300324exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCC
VL3003-24-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC

Клонирование V_H и V_L антитела -003-2F5 и V_L антитела -005 и V_H и V_L антитела -024 в системе pGEMT-вектор II.

Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1% TAE-агарозном геле и окрашивали этидия бромидом. Зоны правильного размера вырезали из геля и выделяли ДНК из агарозы с помощью набора для экстракции гелей QiaexII gel extraction kit (Qiagen, кат. № 20021).

Выделенные из геля ПЦР-фрагменты подвергали при инкубации 10 мин при 72°C с 200 мкМ dATP и 2,5 ед. Amplitaq (Perkin Elmer) и очищали на мини-колонках Minielute (Qiagen). ПЦР-фрагменты с поли-А клонировали в вектор pGEMTeasy (Promega) с помощью набора pGEMT easy vector system II kit и методики (LJ270, с. 3/4). С помощью 2 мкл лигирующей смеси трансформировали компетентные клетки E. coli OneShot DH5αT1R (Invitrogen) и высеивали на чашки с LB/Amp/IPTG/Xgal).

Секвенирование.

V-области антител -003 и -024 и V_L-область антитела -005 секвенировали на фирме AGOWA (Berlin, Германия) после отбора 20 (V_H -003), 16 (V_L -003), 15 (V_L -005) и 6 (V_H- и V_L-024) белых колоний, соответственно, выделения плазмид и секвенирования с помощью обратного праймера M13. V_H-область антитела -005 секвенировали прямо на ПЦР-продукте с помощью праймера HCseq5. Последовательности анализировали с помощью расширенного набора программ Vector NTI (Invitrogen).

Создание экспрессирующих векторов для антител -003, -005, -024 и антитела 3079 фирмы Morphosys.

Кодирующую область V_H антитела -003 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H-область антитела -003, с помощью праймеров VH3003-003for и RACEVHApaI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 (Lonza Biologies, Slough, UK) и идеальную последовательность Козака (GCCGCCACC). Вектор pConG1f0.4 содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека. ПЦР-фрагмент области V_H встраивали в одной рамке считывания в вектор pConG1f0.4 с помощью HindIII и ApaI. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_H антитела -005 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H-область антитела -005, с помощью праймеров VH3003-5for и RACEVHApaI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. ПЦР-фрагмент области V_H встраивали в одной рамке считывания в вектор pConG1f0.4 с помощью HindIII и ApaI. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_H антитела -024 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H-область антитела -024, с помощью праймеров VH300324exfor и RACEVHApaI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. ПЦР-фрагмент области V_H встраивали в одной рамке считывания в вектор pConG1f0.4 с помощью HindIII и ApaI. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_H антитела 3079 фирмы Morphosys синтезировали на фирме GeneArt (Regensburg, Германия) на основе данных, опубликованных в патенте WO 2005/103083 A2. Кодирующую область подвергали оптимизации кодонов для экспрессии в клетках HEK, чтобы повысить уровень экс-

прессии, и вставили подходящие рестрикционные сайты (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. Плазмиду, содержащую синтетическую область V_H, расщепляли с помощью ApaI и HindIII и V_H-фрагмент встраивали в одной рамке считывания в вектор pConG1f0.4.

Кодирующую область V_L антитела -005 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_L-область антитела -005, с помощью праймеров VL3003-5exfor и RACEVLBsiWI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 (Lonza Biologies) и идеальную последовательность Козака. Вектор pConKappa0.4 содержит константную область легкой κ-цепи. ПЦР-фрагмент области V_L встраивали в одной рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_L антитела -003 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_L-область антитела -003, с помощью праймеров VL3003-003for и RACEVLBsiWI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. ПЦР-фрагмент области V_L встраивали в одной рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_L антитела -024 подвергали амплификации методом ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_L-область антитела -024, с помощью праймеров VL3003-24-5exfor и RACEVLBsiWI, вставляя подходящие рестрикционные сайты (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. ПЦР-фрагмент области V_L встраивали в одной рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II. Конструкцию проверяли посредством анализа последовательности.

Кодирующую область V_L антитела 3079 фирмы Morphosys синтезировали на фирме GeneArt на основе данных, опубликованных в WO 2005/103083 A2. Кодирующую область подвергали оптимизации кодонов для экспрессии в клетках HEK, чтобы повысить уровень экспрессии, и вставили подходящие рестрикционные сайты (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. Плазмиду, содержащую синтетическую область V_L, расщепляли с помощью Pfl23II и HindIII и V_L-фрагмент встраивали в одной рамке считывания в вектор pConKappa0.4.

Антитела подвергали транзиентной экспрессии в клетках HEK-293F, как описано в примере 17, путем котрансфекции векторов их тяжелых цепей и легких цепей.

Получение стабильных клеточных линий из клеток CHO-K1SV.

Для получения стабильных клеточных линий векторы тяжелых и легких цепей антитела -003 или -005 объединяли в один двухгенный вектор стандартными методами клонирования.

Двухгенные векторы -003 или -005 подвергали линеаризации и трансфицировали ими клетки CHO-K1SV (Lonza Biologies), в основном как описано производителем. Стабильные клеточные линии отбирали при селекции с помощью 25 мкМ L-метионин-сульфоксимина (MSX), как описано Lonza Biologies. Отбирали самые продуктивные клоны и размножали в среде CD-CHO (Invitrogen), а антитела выделяли из супернатанта культуры клеток, как описано в примере 3.

Пример 17. Картирование эпитопов при помощи направленного мутагенеза.

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали и количественно определяли на фирме Isogen Bioscience (Maarssen, Нидерланды). Праймеры растворяли в H_2O до 100 пмоль/мкл и хранили при -20°C. Сводка по всем праймерам для ПЦР и секвенирования приведена в табл. 6. Для ПЦР использовали ДНК-полимеразу PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Amsterdam, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Каждая реакционная смесь содержала смесь 200 мкМ dNTP (Roche Diagnostics, Almere, Нидерланды), по 10 пмоль прямого и обратного праймера, 100 нг геномной ДНК или 1 нг плазмидной ДНК и 1 ед. ДНК-полимеразы PfuTurbo® Hotstart в буфере для реакции ПЦР (поставляется вместе с полимеразой) в общем объеме 20 мкл. Реакции ПЦР проводили в термоциклере TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Германия), используя программу из 32 циклов: денатурация при 95°C в течение 2 мин; 30 циклов по 30 сек при 95°C, 30 сек при градиенте 60-70°C (или при другой заданной температуре отжига) и 3 мин при 72°C; заключительное наращивание при 72°C в течение 10 мин. При необходимости смеси для ПЦР хранили при 4°C до дальнейшего анализа или обработки.

Электрофорез в агарозном геле проводили согласно Sambrook (Sambrook, Russell et al. 2000), используя гели объемом 50 мл в 1-кратном буфере трис-ацетат-ЭДТА. ДНК проявляли включением в гель этидия бромида и осмотром под УФ. Делали снимки гелей с помощью ПЗС-видеокамеры и системы анализа изображений (GeneGnome; Syngene, через Westburg B.V., Leusden, Нидерланды).

Очистку требуемых ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, через Westburg, Leusden, Нидерланды; номер продукта 28006) согласно инструкциям изготовителя. Выделенную ДНК количественно определяли методом УФ-спектроскопии (см. ниже), а качество оценивали методом электрофореза в агарозном геле.

В качестве альтернативы продукты ПЦР или расщепления разделяли методом электрофореза в агарозном геле (например, при наличии множественных фрагментов), используя 1% агарозные гели с трис-

ацетат-ЭДТА. Нужные фрагменты вырезали из геля и выделяли с помощью набора QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen; номер продукта 20051) согласно инструкциям изготовителя.

Оптическую плотность нуклеиновых кислот определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности (OD) при 260 нм (1 ед. $OD_{260\ нм}$ = 50 мкг/мл). Для всех образцов в качестве холостой пробы использовали буфер, в котором были растворены нуклеиновые кислоты.

Рестрикционные ферменты и принадлежности получали из New England Biolabs (Beverly, MA, USA) или Fermentas (Vilnius, Литва) и использовали согласно инструкциям изготовителей. ДНК (100 нг) расщепляли с помощью 5 ед. фермента в соответствующем буфере в конечном объеме 10 мкл (реакционные объемы варьировали по необходимости). Расщепляемые смеси инкубировали при рекомендованной температуре как минимум 60 мин. Для фрагментов, требующих двойного расщепления с участием несовместимых буферов или температурных режимов, расщепление выполняли поочередно. При необходимости продукты расщепления очищали методом электрофореза в агарозном геле и экстрагирования геля.

Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью набора Quick Ligation Kit (New England Biolabs) согласно инструкциям изготовителя. Для каждой реакции лигирования ДНК вектора смешивали примерно с трехкратным молярным избытком ДНК вставки.

Плазмидную ДНК (1-5 мкл раствора ДНК, обычно 2 мкл смеси для лигирования ДНК) вводили путем трансформации в клетки E. coli One Shot DH5α-$T1^R$ (Invitrogen, Breda, Нидерланды; номер продукта 12297-016) методом теплового шока согласно инструкциям изготовителя. Затем клетки высеивали на агаровые чашки со средой Luria-

Bertani (LB), содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали 16-18 ч при 37°C до появления бактериальных колоний.

Бактериальные колонии подвергали скринингу на наличие векторов, содержащих требуемые последовательности, методом ПЦР на колониях, используя смесь ThermoStart PCR Master Mix (Abgene, через Wetsburg, Leusden, Нидерланды; номер продукта AB-938-DC15/b) и праймеры pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2 (табл. 6). К отобранным колониям слегка прикасались наконечником пипетки на 20 мкл и быстро смывали в 2 мл LB для мелкомасштабного культивирования, а затем ресуспендировали в смеси для ПЦР ПЦР проводили в термоциклере TGradient Thermocycler 96), используя программу из 35 циклов: денатурация при 95°C в течение 15 мин; 35 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 55°C и 2 мин при 72°C; с последующей стадией заключительного наращивания 10 мин при 72°C. При необходимости смеси для ПЦР хранили при 4°C до анализа методом электрофореза в агарозном геле.

Плазмидную ДНК из культур E. coli выделяли с помощью следующих наборов фирмы Qiagen (через Westburg, Leusden, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Для больших препаратов плазмид (50-150 мл культуры) использовали либо набор HiSpeed Plasmid Maxi Kit (номер продукта 12663), либо HiSpeed Plasmid Midi Kit (номер продукта 12643). Для небольших препаратов плазмид (±2 мл культуры) использовали набор Qiaprep Spin Miniprep Kit ((номер продукта 27106), а ДНК элюировали в 50 мкл элюирующего буфера (поставляется вместе с набором).

Конструирование экспрессирующего HA-CD38 вектора pEE13.4HACD38.

Внеклеточный домен CD38 человека подвергали амплификации из плазмиды pCIpuroCD38 (полученной от проф. M. Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK) с помощью праймеров cd38forha и cd38exrev. При этой реакции ПЦР вводилась метка HA. Этот продукт ПЦР использовали в качестве матрицы для второй реакции ПЦР с праймерами SPHMM38ex и cd38exrev. При этой реакции ПЦР вводились сигнальный пептид SPHMM, рестрикционные сайты и идеальная последовательность Козака (GCCGCCACC) для оптимальной экспрессии. После очистки этот ПЦР-фрагмент клонировали в экспрессионный вектор pEE13.4 (Lonza Biologies) и проверяли всю кодирующую последовательность секвенированием с помощью праймеров pConKseq1, pEE13.4seqrev, cd38seq1for и cd38seq2rev (табл. 6). Этой конструкции дали название pEE13.4HACD38.

Направленный мутагенез.

Конструировали три отдельных мутантных белка huCD38, в которых T заменяли на A в положении 237 (T237A, SEQ ID NO: 32), Q заменяли на R в положении 272 (Q272R, SEQ ID NO: 33) или S заменяли на F в положении 274 (S274F, SEQ ID NO: 34). Направленный мутагенез проводили с помощью набора QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Этот метод включает введение дополнительного "молчащего" рестрикционного сайта или удаление рестрикционного сайта для скрининга на правильность мутагенеза (дополнительный сайт Xba1 для мутанта T237A, дополнительный сайт Bcg1 для мутанта Q272R и удаление сайта Ssp1 для мутанта S274F). Вкратце, смешивали 5 мкл 10-кратного буфера для реакции, 1 мкл олигонуклеотида HACD38T237Afor2, HACD38Q272Rfor или HACD38S274Ffor (100 пмоль/мкл), 1 мкл олигонуклеотида HACD38T237Arev2, HACD38Q272Rrev или HACD38S274Frev (100 пмоль/мкл), 1 мкл смеси dNTP, 3 мкл раствора Quicksolution, 1 мкл плазмиды pEE13.4HACD38 (50 нг/мкл/ и 1 мкл ДНК-полимеразы PfuUltra HF в общем объеме 50 мкл и подвергали амплификации в термоциклере TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Германия; номер продукта 050-801), используя программу из 18 циклов:

денатурация при 95°C в течение 1 мин; 18 циклов по 50 с при 95°C, 50 с при 60°C и 10 мин при 68°C. Смеси для ПЦР хранили при 4°C до дальнейшей обработки. Затем смеси для ПЦР инкубировали с 1 мкл DpnI в течение 60 мин при 37°C для расщепления вектора pEE13.4HACD38 WT и хранили при 4°C до дальнейшей обработки. Реакционную смесь осаждали с помощью 5 мкл 3 M NaAc и 125 мкл этанола, инкубировали 20 мин при -20°C и центрифугировали 20 мин при 4°C при 14000×g. Осадок ДНК промывали 70% этанолом, сушили и растворяли в 4 мкл воды. Все 4 мкл использовали для трансформации компетентных клеток E. coli One Shot Top 10DH5α $T1^R$ (Invitrogen, Breda, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя (Invitrogen). Затем клетки высеивали на агаровые чашки со средой Luria-Bertani (LB), содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали 16-18 ч при 37°C до появления бактериальных колоний. Колонии подвергали скринингу методом ПЦР на колониях с помощью праймеров pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2 (табл. 5) с расщеплением соответствующими рестрикционными ферментами для скрининга на включение мутагенного олигонуклеотида. Выращивали два положительных клона для каждого мутанта и выделяли плазмидную ДНК. Анализировали всю кодирующую последовательность HACD38 с помощью праймеров cd38seq1for, pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2 для проверки на наличие мутаций и отсутствие дополнительных нежелательных мутаций.

Секвенирование ДНК.

Образцы плазмидной ДНК отправляли на фирму AGOWA (Berlin, Германия) для анализа последовательности. Последовательности анализировали с помощью расширенной программы Vector NTI (Informax, Oxford, UK).

Транзиентная экспрессия в клетках HEK-293F.

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон HEK-293, адаптированный к росту в суспензии и химически определенной среде Freestyle (HEK-293F)) получали из Invitrogen и трансфицировали вектором pEE13.4HACD38 и тремя конструкциями, несущими мутации T237A, Q272R и S274F, согласно методике изготовителя с использованием 293fectin (Invitrogen). Супернатанты культур трансфицированных клеток использовали в методе ELISA для опытов по связыванию анти-CD38.

Связывание с антителами к CD38.

Планшеты для ELISA (Greiner, # 655092) покрывали в течение ночи при 4°C с помощью 1 мкг антител к HA (Sigma, # H-9658), после чего блокировали с помощью 2% куриной сыворотки. Супернатанты культур трансфицированных клеток HEK293F разбавляли, наносили на планшеты для ELISA и инкубировали 1 час при комн. темп. После отмывки добавляли серийные разведения HuMabs -003 и -005 и инкубировали 1 ч при комн. темп. Связавшиеся антитела детектировали с помощью конъюгированных с HRP козьих антител против IgG человека. Пробы проявляли с помощью ABTS (Roche, # 1112597) и измеряли поглощение при 405 нм на спектрофотометре.

Как видно из фиг. 23A-23C, оба антитела -003 и -005 связываются с CD38 дикого типа человека. На связывание -003 не влияло введение мутаций T237A (фиг. 23A), Q272R (фиг. 23B) или S274F (фиг. 23C). Антитело -005 связывалось с CD38, несущим мутацию T237A (фиг. 23A). На связывание -005 с CD38 сильно повлияла мутация Q272R (фиг. 23B), как в отношении EC_{50}, так и максимальной ёмкости связывания. Антитело -005 не связывалось с мутантным CD38, у которого серин в положении 274 был заменен на фенилаланин (фиг. 23C).

Эти данные показывают, что антитела -003 и -005 связываются с разными эпитопами. Кроме того, эти опыты показали, что связывание -005 с CD38 чувствительно к мутациям в положениях 272 и 274. В частности, S274 особенно необходим для связывания -005 с CD38.

Таблица 6

Праймеры

Наименование	Последовательность
cd38forha	CTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCTACCCTTACGACGTGCCT GACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC
cd38exrev	AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG
SPHMM38ex	TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGG CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCC
pConG1seq1	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
pConKseq1	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pEE13.4seqrev	TGCATTCATTTTATGTTTCAGGT
pEE13.4seqrev2	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
cd38seq1for	AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT
cd38seq2rev	GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG
HACD38T237Arev2	TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACCTTCTC TGGTTG
HACD38T237Afor2	CAACCAGAGAAGGTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTGATACA TGGTGGA
HACD38Q272Rrev	GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTTAT
HACD38Q272Rfor	ATAAGCAAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATATC
HACD38S274Frev	TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAAATTGAATGTTCCTTTTGCTT ATA
HACD38S274Ffor	TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTTCTGCAAGAATATCTA CAGA

Пример 18. Индукция пролиферации PBMC.

Антитела -003, -005 и -024 тестировали методом, который в основном описан в Ausiello et al., Tissue Antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, клетки PBMC от здоровых доноров культивировали при 1×10^5 клеток/лунку в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии антител (конечные концентрации: 1,1 - 3,3 - 10 - 30 мкг/мл) в 200 мкл $RPMI^{++}$. В качестве положительного контроля использовали стимуляцию клеток с помощью IL-15 (при 333 нг/мл; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, США). После 4-дневной инкубации при 37°C добавляли 30 мкл ^{3}H-тимидина (16,7 мкКи/мл) и продолжали культивировать в течение ночи. Включение ^{3}H-тимидина измеряли на гамма-счетчике Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, DT, США) согласно инструкциям изготовителя. Данные представлены в виде среднего значения имп./мин. (± станд. от средн.) у клеток PBMC, полученных от 10 здоровых доноров. Результаты свидетельствуют, что антитела -003 и -005 не индуцируют значительной пролиферации PBMC (фиг. 24A). Также и антитело -024 не индуцирует значительной пролиферации PBMC (данные не приводятся).

Пример 19. Индукция высвобождения IL-6.

Антитела -003, -005 и -024 тестировали методом, который в основном описан в Ausiello et al., Tissue Antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, клетки PBMC культивировали при 1×10^6 клеток/лунку в 48-луночных планшетах в присутствии 20 мкг/мл антител и 10 мкг/мл LPS (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, Нидерланды) в 500 мкл $RPMI^{++}$. После инкубации в течение ночи при 37°C выделяли супернатанты и хранили при -20°C. Концентрацию IL-6 определяли методом ELISA (набор IL-6 ELISA kit, U-CyTech Biosciences, Utrecht, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Данные представлены в виде средней концентрации в пг/мл (± станд. от. средн.) из 7 доноров. Результаты свидетельствуют, что антитела -003 и -005 не индуцируют значительного высвобождения IL-6 (фиг. 24B). Также и антитело -024 не индуцирует значительного высвобождения IL-6 (данные не приводятся).

Пример 19. Индукция высвобождения IFN-γ.

Антитела -003, -005 и -024 тестировали методом, описанным в Ausiello et al., Tissue Antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, клетки PBMC культивировали при 1×10^6 клеток/лунку в 48-луночных планшетах в присутствии 20 мкг/мл антител и 1 мкг/мл OKT-3 (Sanquin, Amsterdam, Нидерланды) в 500 мкл $RPMI^{++}$. После инкубации в течение ночи при 37°C выделяли супернатанты и хранили при -20°C. Концентрацию IFN-γ определяли методом ELISA (набор IFN-γ ELISA kit, U-CyTech Biosciences, Utrecht, Нидерланды) согласно инструкциям изготовителя. Данные представлены в виде средней концентрации в пг/мл (± станд. от. средн.) из 9 доноров. Результаты свидетельствуют, что антитела -003 и -005 не индуцируют значительного высвобождения IFN-γ (фиг. 24C). Также и антитело -024 не индуцирует значительного высвобождения IFN-γ (данные не приводятся).

Пример 20. Сродство связывания антител -003 и -005 с рекомбинантным CD38

Связывание антител -003 и -005 с CD38 оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса. Вкратце, очищенные антитела иммобилизировали на сенсорном чипе CM-5 (Biacore, Uppsala, Швеция) посредством конъюгирования по аминогруппам. Пропускали HA-меченный CD38 (см. пример 3) и детектировали связывание антигена с mAb по изменению показателя преломления на поверхности чипа при помощи Biacore 3000 (Biacore). Константы ассоциации и константы скорости для антител -003

(табл. 7) и -005 (табл. 8) приведены ниже в виде средних значений из 3 опытов ± станд. откл. и они свидетельствуют, что оба антитела -003 и -005 обладают высоким сродством к CD38.

Таблица 7

Константы ассоциации и константы скорости при 25°C

	Антитело -003
k_a (1/Ms)	$2{,}17\times10^{5}$ ± $2{,}65\times10^{4}$
k_d (1/s)	$1{,}90\times10^{-4}$ ± $4{,}51\times10^{-6}$
K_A (1/M)	$1{,}14\times10^{9}$ ± $1{,}58\times10^{8}$
K_D (M)	$8{,}85\times10^{-10}$ ± $1{,}20\times10^{-10}$

Таблица 8

Константы ассоциации и константы скорости при 25°C

	Антитело -005
k_a (1/Ms)	$8{,}88\times10^{4}$ ± $1{,}95\times10^{4}$
k_d (1/s)	$5{,}22\times10^{-4}$ ± $1{,}16\times10^{-5}$
K_A (1/M)	$1{,}70\times10^{8}$ ± $3{,}68\times10^{7}$
K_D (M)	$6{,}06\times10^{-9}$ ± $1{,}21\times10^{-9}$

Пример 22. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов методом PEPSCAN.

По известным методикам (Geysen et al. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998; Slootstra et al. 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. Mol Divers 1:87; Puijk et al. 2001. Segment synthesis. In PCT, The Netherlands, p. 1.) синтезировали перекрывающиеся пептиды: 20-мерный линейный и 15-мерный замкнутый пептид, охватывающие 138 аминокислот на С-конце CD38 человека. Кроме того, на основе С-концевой последовательности создавали однопетлевые пептиды различного размера, охватывающие участок KMYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI, участок CVHNLQPEKVQTLEAWVIHGG и участок CLESIISKRNIQFSAKNIYRC. Кроме того, были разработаны дополнительные наборы, воспроизводящие двухпетлевые участки, состоящие из SKRNIQFSCKNIYR и EKVQTLEAWVIHGG Природные цистеины заменяли на аланины. Пептиды подвергали скринингу методом ELISA, используя мини-карточки для PEPSCAN размером с кредитную карту.

Синтез пептидов.

Пептиды синтезировали по стандартной схеме Fmoc и деблокировали с помощью TFA с поглотителями. После этого деблокированные пептиды обрабатывали на микроматрице 0,5 мМ раствором 2,6-бис(бромометил)пиридина или 2,4,6-трис(бромометил)мезитилена в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,9) с добавлением ацетонитрила (1:1 по объему). Микроматрицы осторожно встряхивали в растворе в течение 30-60 мин, будучи полностью покрытыми раствором. Наконец, микроматрицы тщательно промывали избытком воды Millipore и обрабатывали ультразвуком в буфере, содержащем 1% додецилсульфата натрия и 0,1% β-меркаптоэтанола в PBS (pH 7,2), при 70°C в течение 30 мин с последующей обработкой ультразвуком в воде Millipore еще в течение 45 мин.

Анализ методом PEPSCAN-ELISA.

Полиэтиленовые карточки размером с кредитную карту на 455 лунок, содержащие ковалентно связанные пептиды, инкубировали с сывороткой (например, разведенной 1:1000 блокирующим раствором, содержащим 5% лошадиной сыворотки по объему и 5% овальбумина по весу) (4°C, в течение ночи). После отмывки пептиды инкубировали с конъюгированным с пероксидазой кроличьим антителом против Ig человека (разведение 1:1000, 25°C, 1 ч), а после отмывки добавляли субстрат для пероксидазы (2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат и 2 мкл/мл 3% H_2O_2). Через 1 ч измеряли развитие окраски с помощью ПЗС-видеокамеры и системы обработки изображений. Установка состоит из ПЗС-видеокамеры с объективом на 55 мм (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkor 55 mm f/2.8 lens), адаптера для видеокамеры (Sony Camera adaptor DC-77RR) и комплекта программ для обработки изображений Optimas, версия 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, США; Optimas работает на компьютере с Pentium II).

Метод отображения эпитопов.

Индивидуальные аминокислоты идентифицировали по дипептидным мотивам, представляющим собой наименьшие уникальные единицы в аминокислотной последовательности CD38 человека. Всем дипептидным мотивам, представленным в каждом из 1164 исследованных пептидов, присваивали значения ELISA, полученные для соответствующего целого пептида. Для ранжирования дипептидных мотивов по связыванию от сильного к слабому рассчитывали относительные сигналы путем деления значения ELISA для каждого индивидуального мотива на среднее значение ELISA из всех 1164 исследованных линейных и замкнутых пептидов, и уже эти сигналы располагали в порядке уменьшения. Таким образом, учитывался вклад аминокислот в конформационные эпитопы. Для каждого из исследованных mAb отбирали все дипептидные мотивы, дающие более 2,5 баллов (т.е. значения ELISA у пептидов, содержащих эти мотивы, были по меньшей мере в 2,5 раза выше, чем среднее значение ELISA из значений, получен-

ных у всех 1164 пептидов). Данные подвергали деконволюции на вклады отдельных аминокислот, представленных в линейной последовательности CD38, по системе баллов. Продвигаясь по линейной последовательности CD38 и используя в качестве точки отсчета уникальные дипептидные единицы, каждый раз, когда аминокислота CD38 попадала в это множество дающих высокие баллы пептидов, ей присваивали один балл.

Как оказалось, все антитела -003, -005 и -024 связывались с участками SKRNIQFSCKNIYR и EKVQTLEAWVIHGG у CD38 человека. Антитело -003 особенно хорошо распознавало мотивы RNIQF и WVIH, а антитело -005 особенно хорошо распознавало мотивы KRN и VQTL.

Пример 23. Энзиматическая активность.

Энзиматическую активность CD38 человека измеряли методом, который в основном описан в Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Вкратце, субстрат NGD^+ (80 мкМ) инкубировали с CD38 (0,6 мкг/мл His-меченого внеклеточного домена CD38 человека, см. пример 3 относительно очистки His-CD38) в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl, pH 7,0. Образование cGDPR регистрировали спектрофотометрически при длине волны излучения в 410 нм (возбуждение при 300 нм). В данном примере использовали фильтр для возбуждающего света на 340±60 нм и фильтр для излучаемого света на 430±8 нм.

Для проверки эффекта антител -003, -005 и -024 на энзиматическую активность.

CD38 рекомбинантный белок His-CD38 преинкубировали 15 мин при комнатной температуре с различными антителами при различных концентрациях (30, 3, 0,3 и 0,03 мкг/мл) перед добавлением субстрата NGD^+. Регистрировали образование циклической GDP-рибозы (cGDPR) через различные промежутки времени после добавления антител (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 75 и 90 мин).

Из фиг. 25B видно, что антитело -005 оказывает выраженный ингибирующий эффект на образование cGDPR. Через 90 мин добавление 30 и 3 мкг/мл антитела -005 приводило к снижению образования cGDPR на 32 и 34% (табл. 9). Аналогичные результаты наблюдались в независимых экспериментах с использованием других партий антитела -005.

Ингибирующий эффект на образование cGDPR не наблюдался после добавления антитела -003 (фиг. 25B, табл. 9), -024 (фиг. 25D, табл. 9) или антитела против KLH (фиг. 25A, табл. 9).

Исходя из этих данных, следует ожидать, что антитело -005 также будет ингибировать синтез циклической ADP-рибозы (cADPR) из NAD^+. Ингибирование синтеза cADPR можно определять методом ВЭЖХ, описанным в Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

Таблица 9

Образование cGDP-рибозы в присутствии специфичных к CD38 антител или антитела против KLH

Антитело	**Образование cGDPR (% от контроля на NGD)**			
	30 мкг/мл	**3 мкг/мл**	**0,3 мкг/мл**	**0,03 мкг/мл**
KLH	110	99	108	111
-003	99	100	107	107
-005	68	66	98	102
-024	99	100	104	105

Пример 24. Сравнение антител -003 и -005 с антителом 3079 фирмы Morphosys.

Антитела -003 и -005 подвергали функциональному сравнению с антителом 3079 фирмы Morphosys (TH-3079). Методы клонирования и экспрессирования антитела TH-3079 фирмы Morphosys описаны в примере 16. Методы выполнения CDC описаны в примере 6. Методы выполнения ADCC описаны в примере 5. Из фиг. 26A видно, что антитела -003 и -005 и TH-3079 вызывают посредством CDC лизис трансфицированных CD38 клеток CHO с одинаковой максимальной степенью лизиса. При сравнении значений EC_{50} антитело -005 лучше, чем TH3079, вызывало лизис клеток CHO-CD38, проявляя в 2 раза меньшее значение EC_{50} (см. табл. 10).

Из фиг. 26B видно, что антитело -005 лучше, чем TH3079 вызывает посредством CDC лизис клеток Daudi с люциферазой, причем максимальная степень лизиса под действием -005 была в 2-3 раза выше, чем у TH3079. При сравнении значений EC_{50} антитело -005 оказалось близким к TH-3079 при лизисе клеток Daudi с люциферазой (см. табл. 10). Антитело -003 не вызывает посредством CDC значительного лизиса клеток Daudi с люциферазой.

Из фиг. 26C видно, что в этом эксперименте антитела -005, -003 и TH-3079 вызывают лизис искомых клеток Daudi посредством ADCC. Не обнаружено отличий по значениям (log) EC_{50} и максимальной степени лизиса (табл. 11, n=5).

Таблица 10

Максимальная степень лизиса и значения EC_{50} специфичных к CD38 антител при CDC

Антитело	Клетки CHO-CD38 (n=2)		Клетки Daudi-luc (n=2)	
	EC_{50}, мкг/мл	Макс. лизис, %	EC_{50}, мкг/мл	Макс. лизис, %
-005	0,15 ± 0,007	76,5 ± 3,54	0,39 ± 0,00	70,5 ± 7,78
TH-3079	0,31 ± 0,021	81,5 ± 7,78	0,34 ± 0,26	25,5 ± 12,02
-003	4,50 ± 0,933	62,0 ± 16,79	nc	12,0 ± 8,49

Таблица 11

Максимальная степень лизиса и значения EC_{50} специфичных к CD38 антител при ADCC

Антитело	Log EC_{50}	STD log EC_{50}	Макс. лизис, %	STD макс. лизиса
-005	0,76	0,18	49,2	12,8
TH-3079	1,17	0,23	64,0	14,2
-003	0,96	0,10	43,8	12,0

Пример 25. Ингибирование энзиматической активности экспрессируемого клетками CD38.

Энзиматическую активность экспрессируемого клетками CD38 человека измеряли методом, который в основном описан в Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Вкратце, субстрат NGD^+ (80 мкМ) инкубировали с 10^5 клеток CHO, трансфицированных CD38 человека (клетки CHO-CD38), в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl, pH 7,0, с добавлением 30 мкг/мл IgG1. Образование cGDPR регистрировали спектрофото-метрически при длине волны излучения 410 нм (возбуждение при 300 нм). В данном примере использовали фильтр для возбуждающего света на 340±60 нм и фильтр для излучаемого света на 430±8 нм.

Для проверки эффекта антител -005 и -003 на энзиматическую активность экспрессируемого клетками CD38 клетки CHO-CD38 преинкубировали 15 мин при комнатной температуре с различными антителами при различных концентрациях (30, 3, 0,3 и 0,03 мкг/мл) перед добавлением субстрата NGD. Регистрировали образование циклической cGDPR через различные промежутки времени после добавления субстрата NGD (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 112 и 156 мин).

Через 156 мин добавление 30 и 3 мкг/мл антитела -005 приводило к снижению образования cGDPR на 21 и 18%. Ингибирующий эффект на образование cGDPR не наблюдался после добавления антитела -003 или контрольного антитела против IgG1 (табл. 12).

Таблица 12

Образование cGDP-рибозы в присутствии специфичных к CD38 антител или контроля на IgG1

Антитело	Образование cGDPR (% от контроля на NGD)			
	30 мкг/мл	3 мкг/мл	0,3 мкг/мл	0,03 мкг/мл
Контроль на IgG1	104	105	103	104
-003	107	106	107	105
-005	79	82	100	104

Пример 26. Связывание антитела -005 с трансформированными EBV B-клетками шимпанзе.

После выделения и подсчета трансформированные EBV B-клетки шимпанзе (полученные из Biomedical Primate Research Centre, Department Immunobiology, Rijswijk, Нидерланды) ресуспендировали (1×10^6 клеток/мл) в PBS-BSA (PBS с добавлением 0,1% BSA и 0,02% Na-азида). Затем клетки наносили на 96-луночные планшеты с V-образным дном (100 мкл/лунку) и дважды промывали PBS-BSA. После этого к клеткам добавляли 50 мкл раствора меченного FITC антитела -005 в PBS-BSA (4°C, 30 мин). Клетки отмывали три раза и детектировали специфическое связывание антител -005 с трансформированными EBV B-клетками шимпанзе методом проточной цитометрии. В качестве контроля использовали меченное FITC HuMab-KLH (моноклональное антитело человека против KLH (гемоцианина моллюска блюдечко), полученное на фирме Genmab B.V., Utrecht, Нидерланды, по методикам иммунизации, описанным далее в настоящем изобретении). На фиг. 27 представлено дозозависимое связывание антитела -005 с трансформированными EBV B-клетками шимпанзе. Дозозависимое связывание с трансформированными EBV B-клетками шимпанзе не наблюдалось у контрольного антитела HuMab-KLH.

Пример 27. Комбинированная обработка антителом -005 с дексаметазоном и бортезомибом in vitro.

Антитело -005 тестировали на его способность индуцировать гибель клеток линии UM6 множественной миеломы in vitro по схеме тройной комбинации с дексаметазоном (Dex) и бортезомибом (Bor; Velcade®). Результаты тройной обработки сравнивали с обработкой препаратами поодиночке или двойной комбинированной обработкой.

Инкубировали 3×10^5 клеток UM6 в течение ночи при 37°C с одной лишь средой, с Dex (20 мкМ), с Bor (15 пМ) или с комбинацией Bor и Dex. Через 23 ч добавляли антитело -005 (10 мкг/мл), а через 15 мин после этого добавляли нормальную сыворотку человека и инкубировали образцы еще 45 мин при 37°C. Наконец, добавляли 10 мкл пропидия йодида (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.; 10 мкг/мл) и детекти-

ровали лизис клеток методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur™ (Becton Dickinson) по измерению процентного содержания PI-положительных клеток.

Как видно из фиг. 28, при тройной обработке наблюдается лизис, превосходящий любые одинарные или двойные комбинированные обработки. Этот эффект отмечался в двух независимых экспериментах.

Пример 28.

Пациентов с клиническим диагнозом множественной миеломы подвергают лечению с помощью комбинации из антитела -005 к CD38, мефалана и преднизона.

Соединения вводятся пациентам по следующей схеме дозировки:

антитело -005:	8 мг/кг раз в неделю на протяжении 4 недель (внутривенно)
мелфалан:	0,2 мг/кг в день внутривенно на протяжении 4 дней раз в 4-6 недель
преднизон:	2 мг/кг перорально на протяжении 4 дней раз в 4-6 недель.

Реакция на лечение определяется по снижению М-белка в сыворотке, снижению числа плазмоцитов в костном мозге и снижению белка Бенс-Джонса в моче и уменьшению/отсутствию новых остеолитических повреждений костей.

Пример 29.

Пациентов с клиническим диагнозом множественной миеломы подвергают лечению с помощью комбинации из антитела -005 к CD38, талидомида и дексаметазона.

Соединения вводятся пациентам по следующей схеме дозировки:

антитело -005:	8 мг/кг раз в неделю на протяжении 4 недель (внутривенно)
талидомид:	200 мг/день (перорально)
дексаметазон:	40 мг/день на 1-4, 9-12 и 17-20 день каждого 28-дневного цикла (перорально).

Реакция на лечение определяется по снижению М-белка в сыворотке, снижению числа плазмоцитов в костном мозге и снижению белка Бенс-Джонса в моче и уменьшению/отсутствию новых остеолитических повреждений костей.

Пример 30.

Пациентов с клиническим диагнозом множественной миеломы подвергают лечению с помощью комбинации из антитела -005 к CD38, леналидомида и дексаметазона.

Соединения вводятся пациентам по следующей схеме дозировки:

антитело -005:	8 мг/кг раз в неделю на протяжении 4 недель (внутривенно)
леналидомид:	200 мг/день (перорально)
дексаметазон:	40 мг/день на 1-4, 9-12 и 17-20 день каждого 28-дневного цикла (перорально).

Реакция на лечение определяется по снижению М-белка в сыворотке, снижению числа плазмоцитов в костном мозге и снижению белка Бенс-Джонса в моче и уменьшению/отсутствию новых остеолитических повреждений костей.

Пример 31.

Пациентов с клиническим диагнозом множественной миеломы подвергают лечению с помощью комбинации из антитела -005 к CD38, бортезомиба и дексаметазона.

Соединения вводятся пациентам по следующей схеме дозировки:

антитело -005:	8 мг/кг раз в неделю на протяжении 4 недель (внутривенно)
бортезомиб:	1,3 мг/м^2 на 1, 4, 6 и 11 день каждого 21-дневного цикла (внутривенно)
дексаметазон:	40 мг/день на 1-4, 9-12 и 17-20 день каждого 28-дневного цикла (перорально).

Реакция на лечение определяется по снижению М-белка в сыворотке, снижению числа плазмоцитов в костном мозге и снижению белка Бенс-Джонса в моче и уменьшению/отсутствию новых остеолитических повреждений костей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение указанному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося с CD38;

ii) по меньшей мере одного кортикостероида;

iii) по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

2. Способ лечения опухоли, содержащей опухолевые клетки, экспрессирующие CD38, у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение указанному индивидууму:

i) неагонистического антитела, связывающегося с CD38;

ii) по меньшей мере одного кортикостероида;

iii) по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

3. Способ по п.1 или 2, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает цитотоксическое средство и/или ингибитор ангиогенеза.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает алкилирующее средство.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает одно или более средств, выбранных из группы, состоящей из мелфалана, мехлорэтамина, тиоэпа, хлорамбуцила, кармустина (BSNU), ломустина (CCNU), циклофосфамида, бусульфана, дибромманнитола, стрептозотоцина, дакарбазина (DTIC), прокарбазина, митомицина С, цисплатина и других производных платины, например карбоплатина.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, например талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC-4047 (Actimid™).

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает ингибитор протеасом, например бортезомиб (Velcade®).

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает алкалоид барвинка, например винкристин.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает антрациклин, такой как доксорубицин.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает глюкокортикоид.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает мелфалан и талидомид.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид и/или леналидомид.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает винкристин и/или доксорубицин.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид.

19. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает бортезомиб.

20. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое

средство включает бортезомиб и дополнительно включает мелфалан.

21. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает леналидомид.

22. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает бортезомиб.

23. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает CC-4047.

24. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает леналидомид и дополнительно включает бортезомиб.

25. Способ по любому из пп.1-17, в котором указанный по меньшей мере один кортикостероид включает дексаметазон, а указанное по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает талидомид и дополнительно включает бортезомиб.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий дополнительное введение α-интерферона.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

28. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой моноклональное антитело человека.

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело является антагонистом CD38.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое не вызывает высвобождения значительного количества IL-6 из моноцитов или мононуклеарных клеток периферической крови человека при определении способом, раскрытым в примере 19 описания.

31. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое не вызывает высвобождения заметного количества IFN-γ из Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови человека при определении способом, раскрытым в примере 20 описания.

32. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое интернализируется клетками, экспрессирующими CD38, например интернализируется клетками CHO-CD38 в течение 5-15 мин при 37°C с использованием методики, раскрытой в примере 12 описания.

33. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое вызывает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), к примеру, со значением EC_{50} менее 15 нг/мл, например, менее 10 нг/мл в клетках Daudi-luc и со значением EC_{50} менее 75 нг/мл, например, менее 50, 30 или 10 нг/мл в клетках множественной миеломы (MM) при определении способом, раскрытым в примере 5 описания.

34. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое вызывает комплементзависимую цитотоксичность (CDC) в присутствии комплемента, к примеру, со значением EC_{50} менее 5 мкг/мл, например, менее 1 мкг/мл в клетках Daudi-luc или CD38-CHO с использованием методики, раскрытой в примере 6 описания.

35. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое ингибирует синтез cGDPR.

36. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое ингибирует синтез cADPR.

37. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое связывается с CD38 человека с аффинностью (K_D) менее 10^{-8} M, например, в интервале от 10^{-8} до 10^{-11} M, например, в интервале от 7×10^{-9} до 10^{-10} M при определении методом поверхностного плазмонного резонанса, раскрытым в примере 20 описания.

38. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, которое ингибирует синтез cGDPR по меньшей мере на 25%, например, по меньшей мере на 30% через 90 мин при концентрации в 3 мкг/мл при определении спектрофотометрическим методом, раскрытым в примере 24 описания.

39. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, или антитело, которое конкурирует за связывание с CD38 с указанным антителом, например связываясь с тем же эпитопом, что и указанное антитело.

40. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10.

41. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 3, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 4, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 9, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10.

42. Способ по любому из пп.39-41, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 2, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

43. Способ по любому из пп.39-42, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 7, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, или область V_H, содержащую 1-5, например, 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7.

44. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20, или антитело, которое конкурирует за связывание с CD38 с указанным антителом, например связываясь с тем же эпитопом, что и указанное антитело.

45. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20.

46. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 14, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 19, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20.

47. Способ по любому из пп.44-46, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 12, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

48. Способ по любому из пп.44-47, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 17, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, или область V_H, содержащую 1-5, например, 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 17.

49. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30, или антитело, которое конкурирует за связывание с CD38 с указанным антителом, например связываясь с тем же эпитопом, что и указанное антитело.

50. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 25, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30.

51. Способ по любому из пп.1-38, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 23, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 25, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 28, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 29, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30.

52. Способ по любому из пп.49-51, в котором указанное антитело представляет собой антитело, со-

держащее область V_L, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 22, или область V_L, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22.

53. Способ по любому из пп.49-52, в котором указанное антитело представляет собой антитело, содержащее область V_H, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 27, или область V_H, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, или область V_H, содержащую 1-5, например, 1-3 аминокислотные замены, делеции или вставки по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 27.

54. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело типа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, например антитело типа IgG1, предпочтительно антитело IgG1κ либо антитело типа IgM, предпочтительно антитело IgMκ.

55. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой моноклональное антитело человека, включающее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которой происходит из зародышевой последовательности Hv1263/3M28 (V_HI) человека, и вариабельную область легкой цепи, аминокислотная последовательность которой происходит из зародышевой последовательности L15 (VκI) человека; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которой происходит из зародышевой последовательности V_H3-DP-47/V3-23 (V_HIII) человека, и вариабельную область легкой цепи, аминокислотная последовательность которой происходит из зародышевой последовательности L6 (VκI) человека.

56. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело представляет собой фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.

57. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, радиоизотопом, иммунодепрессантом или химиотерапевтическим лекарственным средством.

58. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело входит в состав биспецифичной или мультиспецифичной молекулы, которая также содержит молекулу, специфически связывающуюся с эффекторными клетками человека.

59. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело входит в состав биспецифичной или мультиспецифичной молекулы, которая также содержит молекулу, специфически связывающуюся с CD3, CD4, CD138, IL-15R, соединенным с мембраной или соединенным с рецептором TNF-α, Fc-рецептором человека либо соединенным с мембраной или соединенным с рецептором IL-15.

60. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанные опухолевые клетки представляют собой клетки множественной миеломы или клетки хронического лимфоцитарного лейкоза.

61. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанные опухолевые клетки представляют собой клетки рецидивирующей или рефрактерной опухоли.

62. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором возраст указанного индивидуума составляет 65 лет или более.

63. Способ по любому из пп.1-61, в котором возраст указанного индивидуума составляет менее 65 лет.

64. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный индивидуум не подвергался предшествующей противораковой терапии того же самого ракового заболевания.

65. Способ по любому из пп.1-63, в котором указанный индивидуум не реагировал на предшествующую противораковую терапию того же самого ракового заболевания.

66. Способ по любому из пп.1-63 или 65, в котором указанный индивидуум ранее подвергался аутологической пересадке периферических стволовых клеток или костного мозга.

67. Способ по любому из пп.1-66, в котором указанный индивидуум включен в список на аутологическую пересадку периферических стволовых клеток или костного мозга.

68. Способ по любому из предшествующих пунктов, после которого следует аутологическая пересадка периферических стволовых клеток или костного мозга

69. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором антитело, по меньшей мере один кортикостероид и по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство вводят одновременно.

70. Способ по любому из пп.1-68, в котором антитело, по меньшей мере один кортикостероид и по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство вводят последовательно.

71. Способ по любому из пп.1-69, в котором антитело, по меньшей мере один кортикостероид и по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство все вводят по отдельности.

72. Способ по любому из пп.1-68, в котором антитело, по меньшей мере один кортикостероид и по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство входят в состав одной или

двух фармацевтических композиций, которые вводят совместно.

73. Способ по п.70, в котором антитело вводят по меньшей мере за 1 день, например, по меньшей мере за 2 дня, предпочтительно по меньшей мере за 1 неделю до введения указанного по меньшей мере одного кортикостероида и указанного по меньшей мере одного некортикостероидного химиотерапевтического средства.

74. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором антитело вводят в дозе 1 мг/кг или более, например, в дозе от 1 до 20 мг/кг, например, в дозе от 5 до 20 мг/кг, предпочтительно в дозе 8 мг/кг.

75. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором антитело вводят раз в неделю на протяжении от 2 до 12 недель, например, от 3 до 10 недель, предпочтительно от 4 до 8 недель.

76. Способ по любому из пп.2-75, в котором опухоль представляет собой множественную миелому или хронический лимфоцитарный лейкоз.

77. Терапевтическая комбинация для ингибирования роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, которая включает:

i) неагонистическое антитело, связывающееся с CD38;

ii) по меньшей мере один кортикостероид;

iii) по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство,

причем комбинация пригодна для раздельного введения и указанные три типа лекарственных средств могут быть введены одновременно или последовательно.

78. Терапевтическая комбинация по п.77, где неагонистическое антитело конкурирует за связывание с CD38 (например, за связывание с тем же эпитопом CD38) с антителом, содержащим:

(a) вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 3, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 4, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 9, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10;

(b) вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 14, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 19, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20; и/или

(c) вариабельные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем вариабельная область легкой цепи содержит участок CDR1 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 23, участок CDR2 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24, и участок CDR3 из V_L, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 25, а вариабельная область тяжелой цепи содержит участок CDR1 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 28, участок CDR2 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 29, и участок CDR3 из V_H, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30.

79. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77, 78, где по меньшей мере один кортикостероид включает преднизон, дексаметазон или оба соединения.

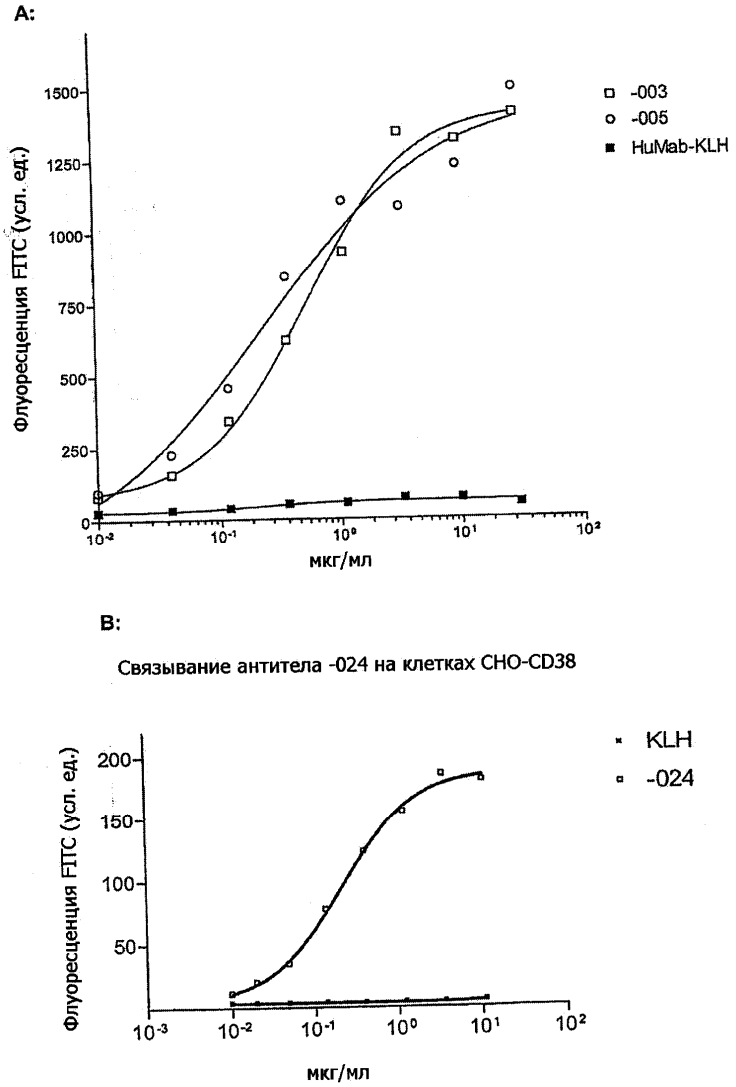
80. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77-79, где по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из мелфалана, мехлорэтамина, тиоэпа, хлорамбуцила, кармустина (BSNU), ломустина (CCNU), циклофосфамида, бусульфана, дибромманнитола, стрептозотоцина, дакарбазина (DTIC), прокарбазина, митомицина C, цисплатина и других производных платины, например карбоплатина.

81. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77-80, где по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает производное глутаминовой кислоты, например, талидомид (Thalomid®) или аналог талидомида, например CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) или CC-4047 (Actimid™).

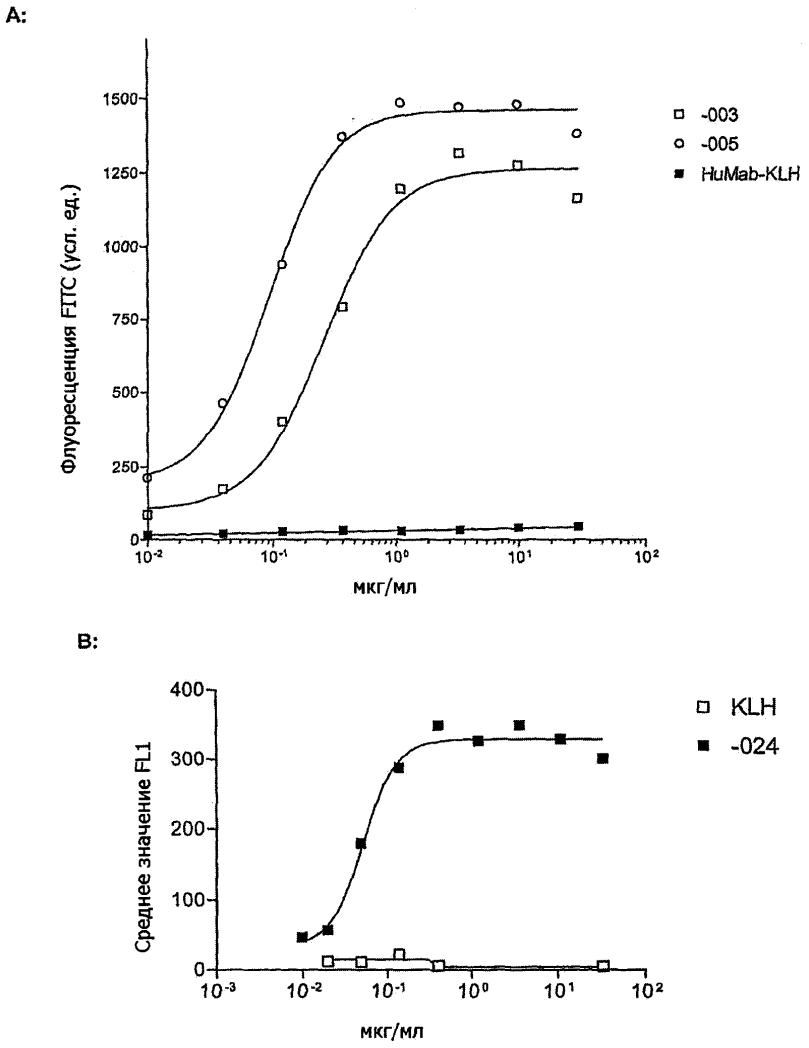
82. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77-81, где по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает ингибитор протеасом, например бортезомиб (Velcade®).

83. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77-82, где по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает алкалоид барвинка, например винкристин.

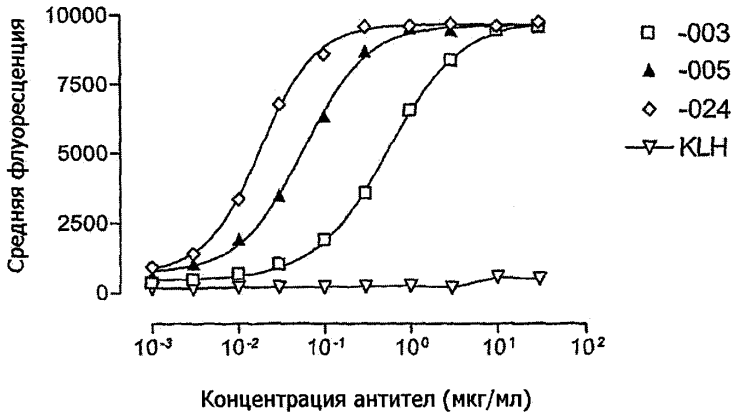
84. Терапевтическая комбинация по любому из пп.77-83, где по меньшей мере одно некортикостероидное химиотерапевтическое средство включает антрациклин, например доксорубицин.


A:
Флуоресценция FITC (усл. ед.)
1500
1250
1000
750
500
250
0
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
мкг/мл
-003
-005
HuMab-KLH
B:
Связывание антитела -024 на клетках CHO-CD38
Флуоресценция FITC (усл. ед.)
200
150
100
50
10⁻³
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
мкг/мл
KLH
-024

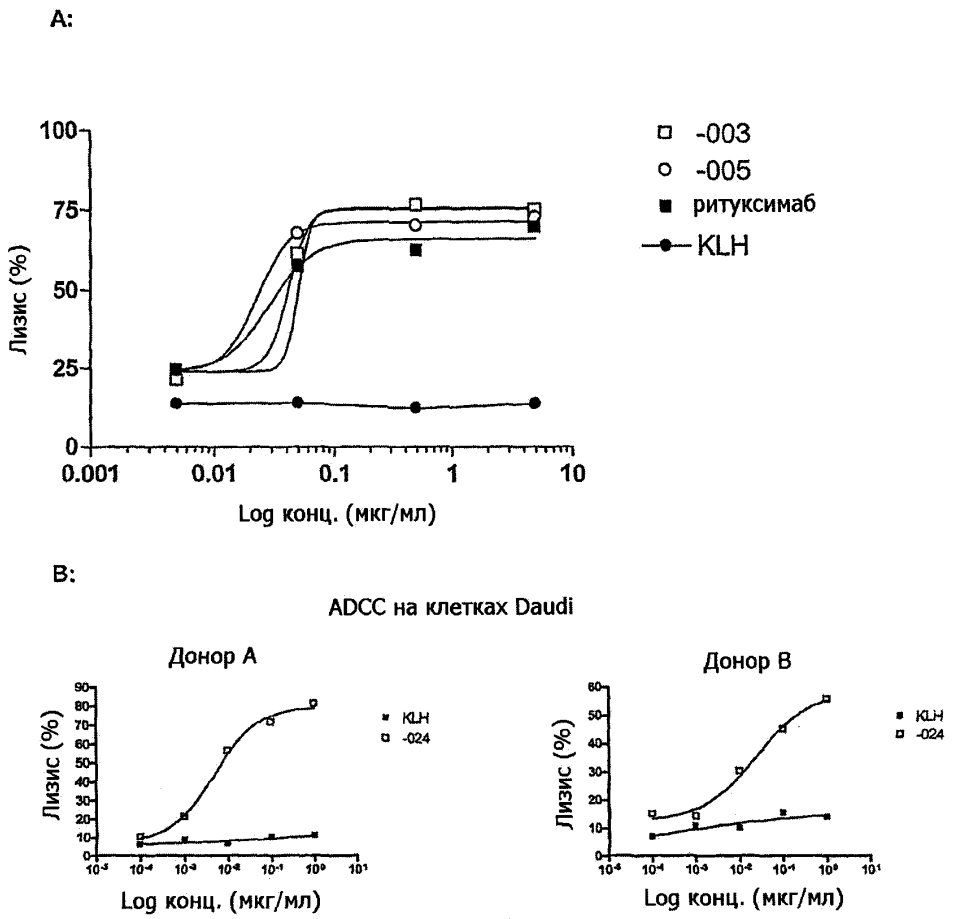
Фиг. 1


A:
Флуоресценция FITC (усл. ед.)
1500
1250
1000
750
500
250
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
мкг/мл
-003
-005
HuMab-KLH
B:
Среднее значение FL1
400
300
200
100
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
мкг/мл
KLH
-024

Фиг. 2

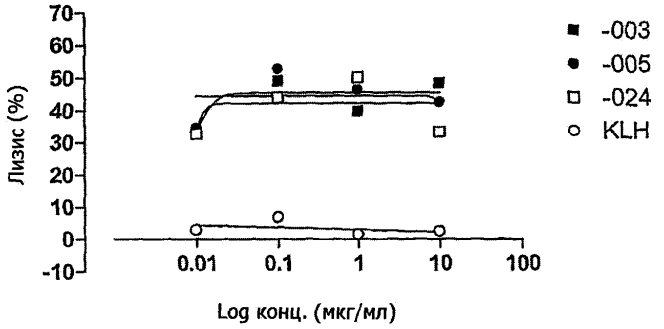

Средняя флуоресценция
10000
7500
5000
2500
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Концентрация антител (мкг/мл)
-003
-005
-024
KLH

Фиг. 3

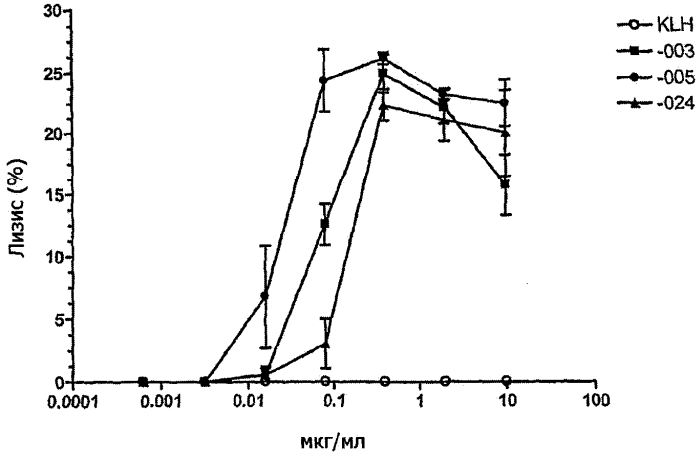

A:
100
75
50
25
0
Лизис (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
Log конц. (мкг/мл)
-003
-005
ритуксимаб
KLH
B:
ADCC на клетках Daudi
Донор A
Лизис (%)
KLH
-024
Log конц. (мкг/мл)
Донор B
Лизис (%)
KLH
-024
Log конц. (мкг/мл)

Фиг. 4

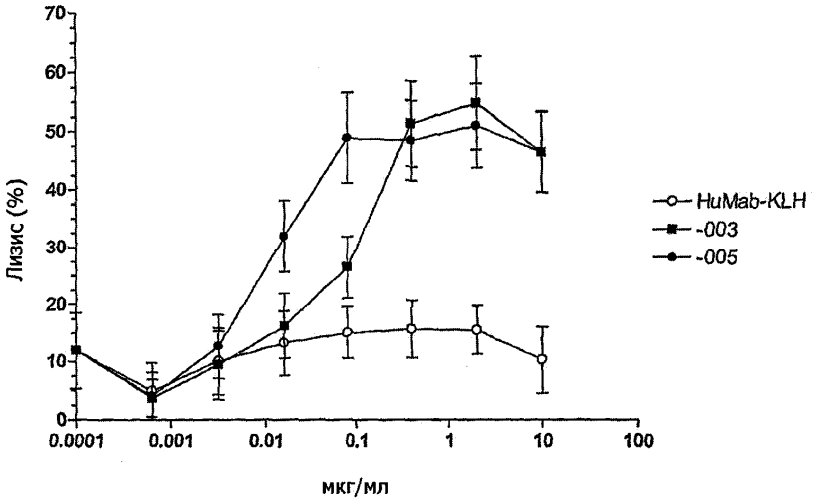
A:


70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Лизис (%)
0.01
0.1
1
10
100
Log конц. (мкг/мл)
-003
-005
-024
KLH

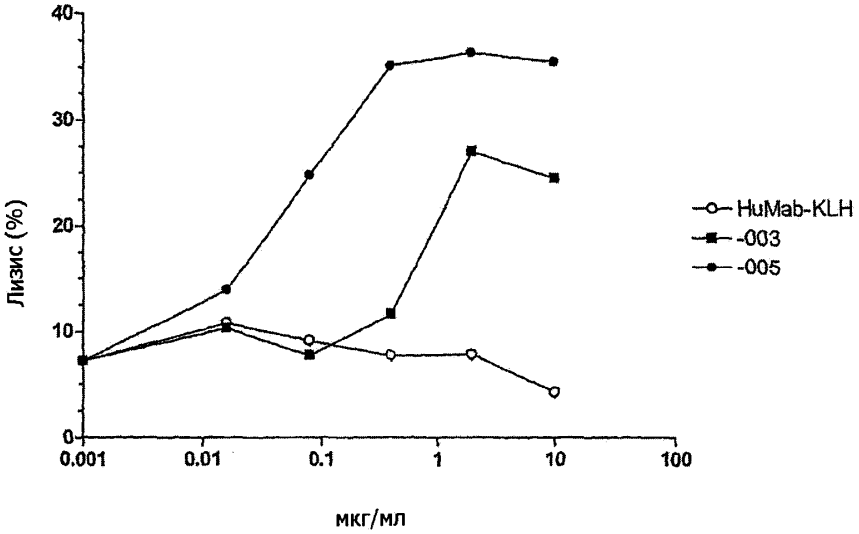
B:


30
25
20
15
10
5
0
Лизис (%)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
KLH
-003
-005
-024

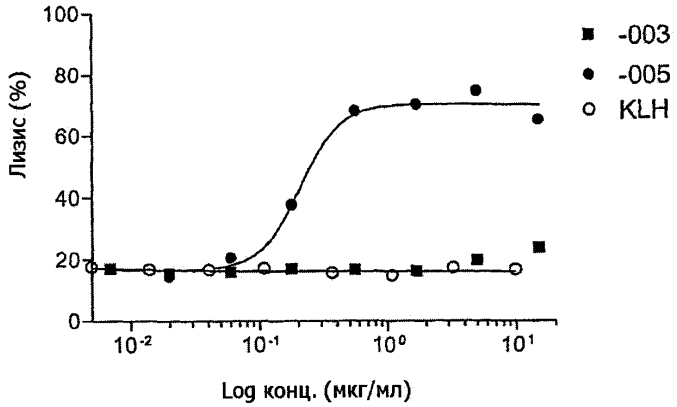
Фиг. 5


70
60
50
40
30
20
10
0
Лизис (%)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
HuMab-KLH
-003
-005

Фиг. 6

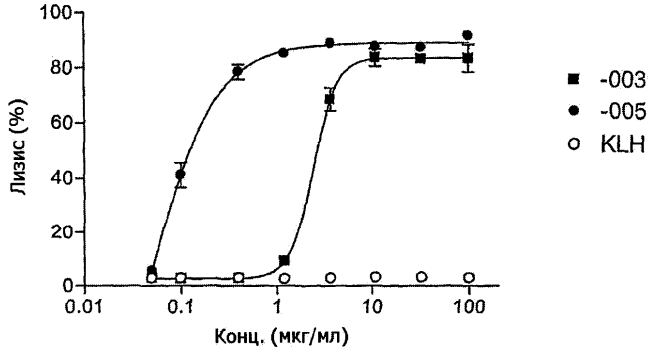

40
30
20
10
0
Лизис (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
HuMab-KLH
-003
-005

Фиг. 7

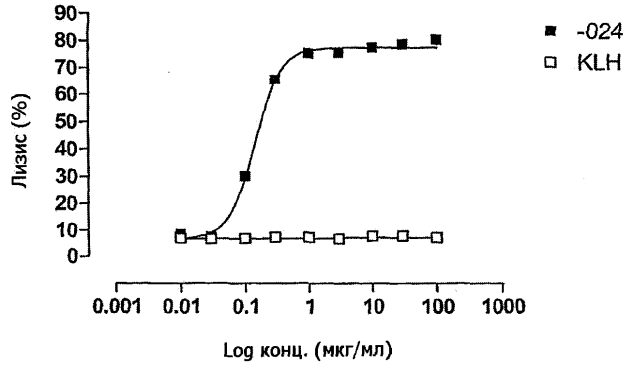

100
80
60
40
20
0
Лизис (%)
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
Log конц. (мкг/мл)
-003
-005
KLH

Фиг. 8

A:

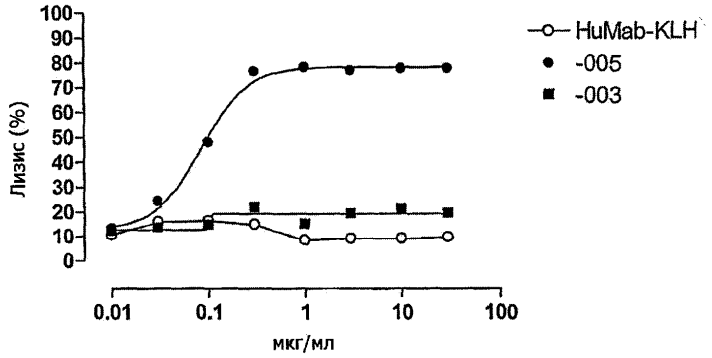

100
80
60
40
20
0
Лизис (%)
0.01
0.1
1
10
100
Конц. (мкг/мл)
-003
-005
KLH

B:

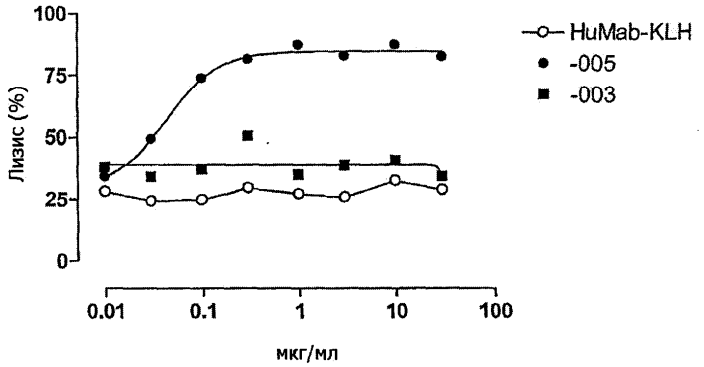

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Лизис (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Log конц. (мкг/мл)
-024
KLH

Фиг. 9

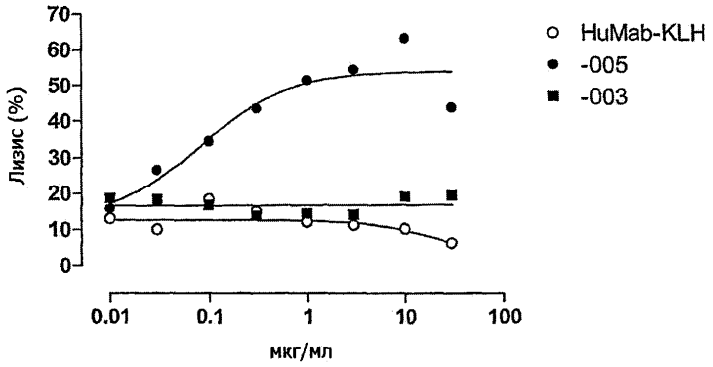
A:


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Лизис (%)
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
HuMab-KLH
-005
-003

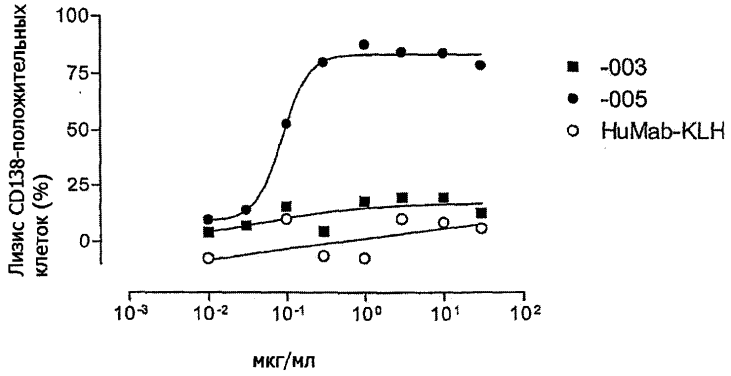
B:


100
75
50
25
0
Лизис (%)
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
HuMab-KLH
-005
-003

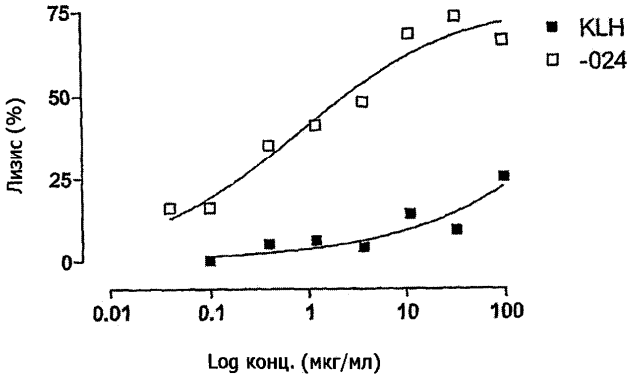
C:



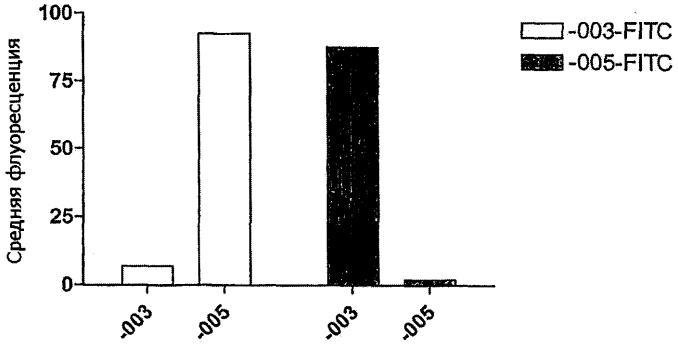
D:



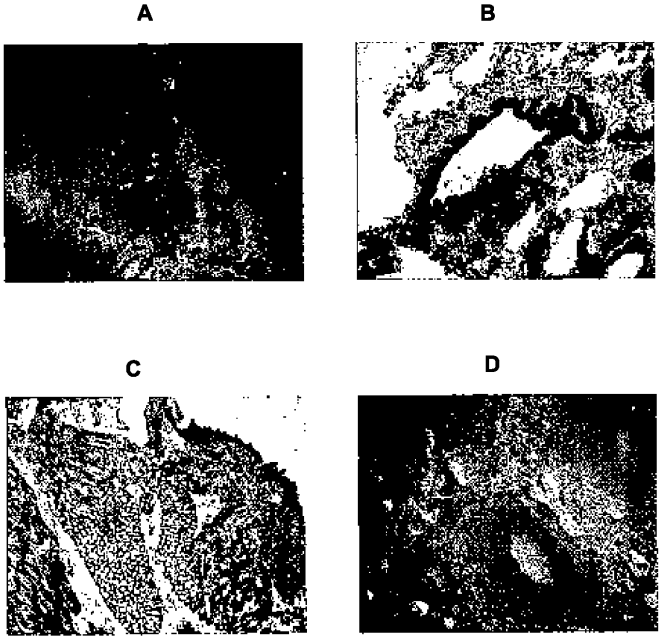
E:



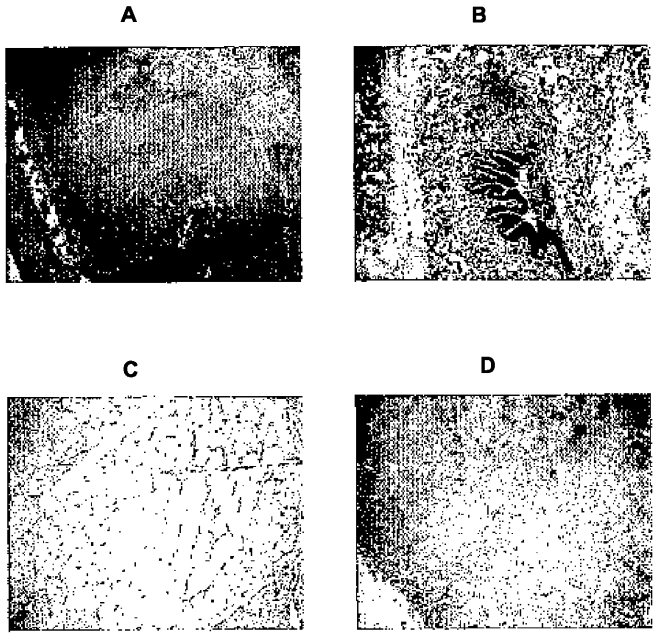
Фиг. 10



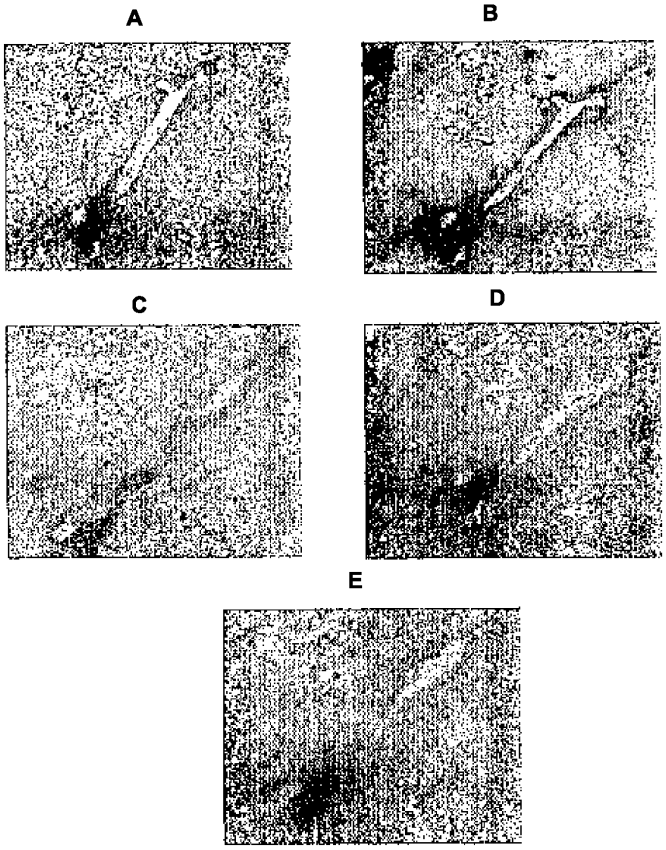
Фиг. 11



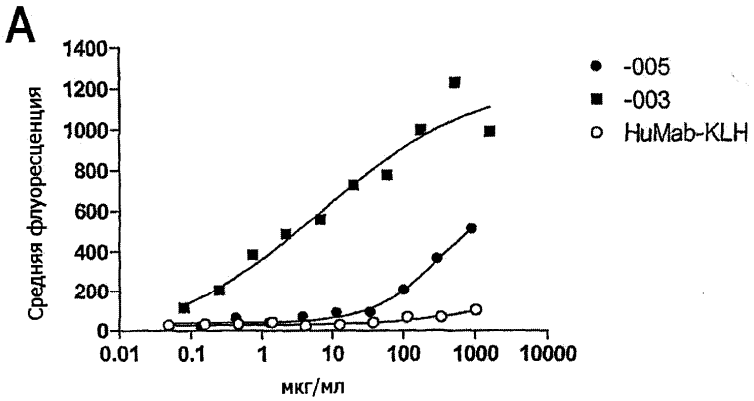
Фиг. 12

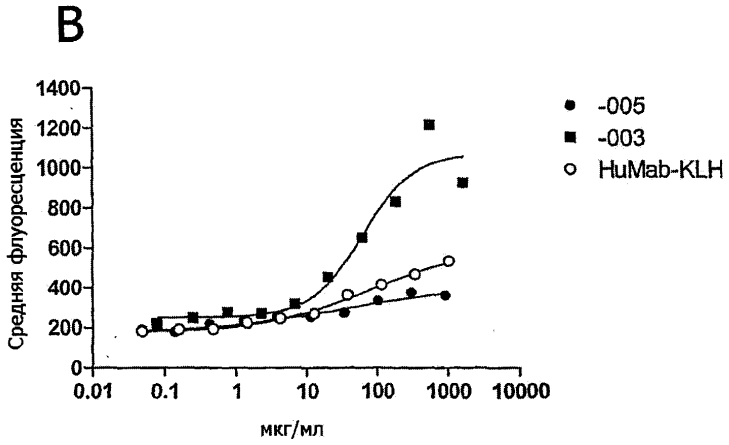


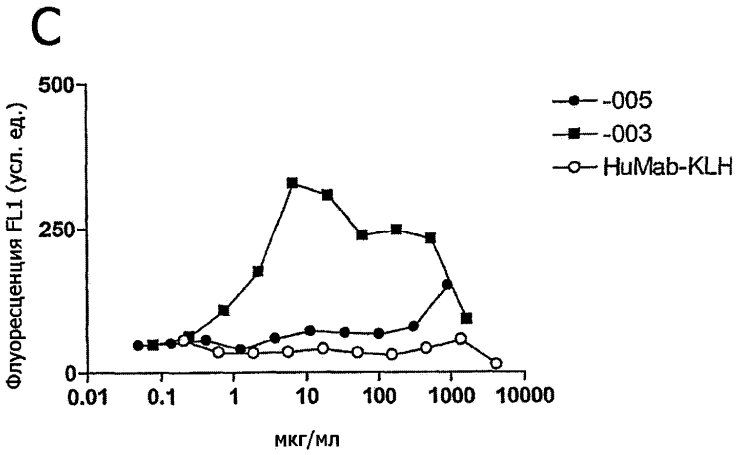
Фиг. 13


A
B
C
D
E

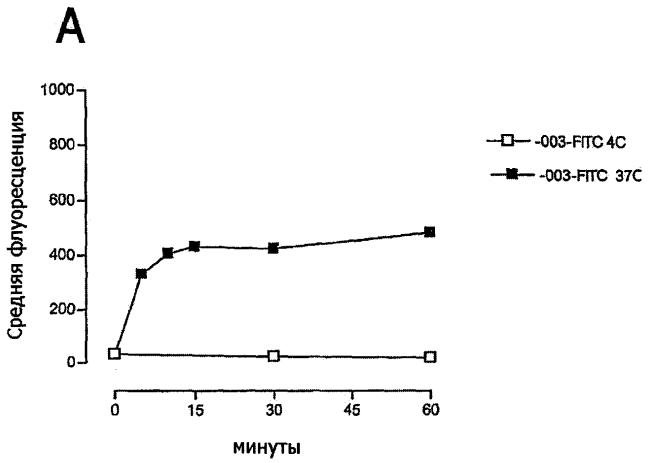
Фиг. 14

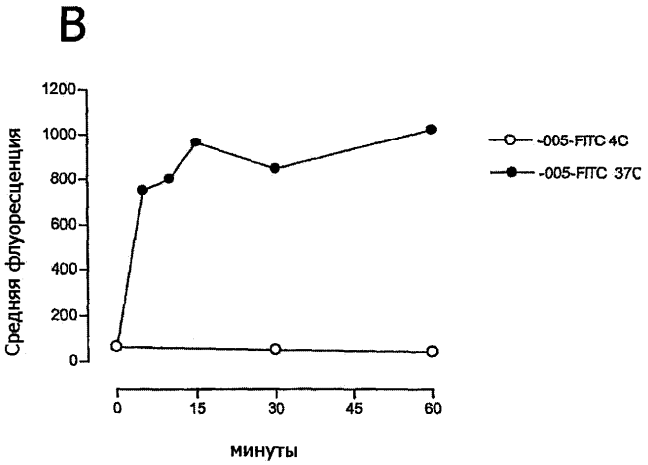

A
Средняя флуоресценция
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
мкг/мл
-005
-003
HuMab-KLH


B
Средняя флуоресценция
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
мкг/мл
-005
-003
HuMab-KLH

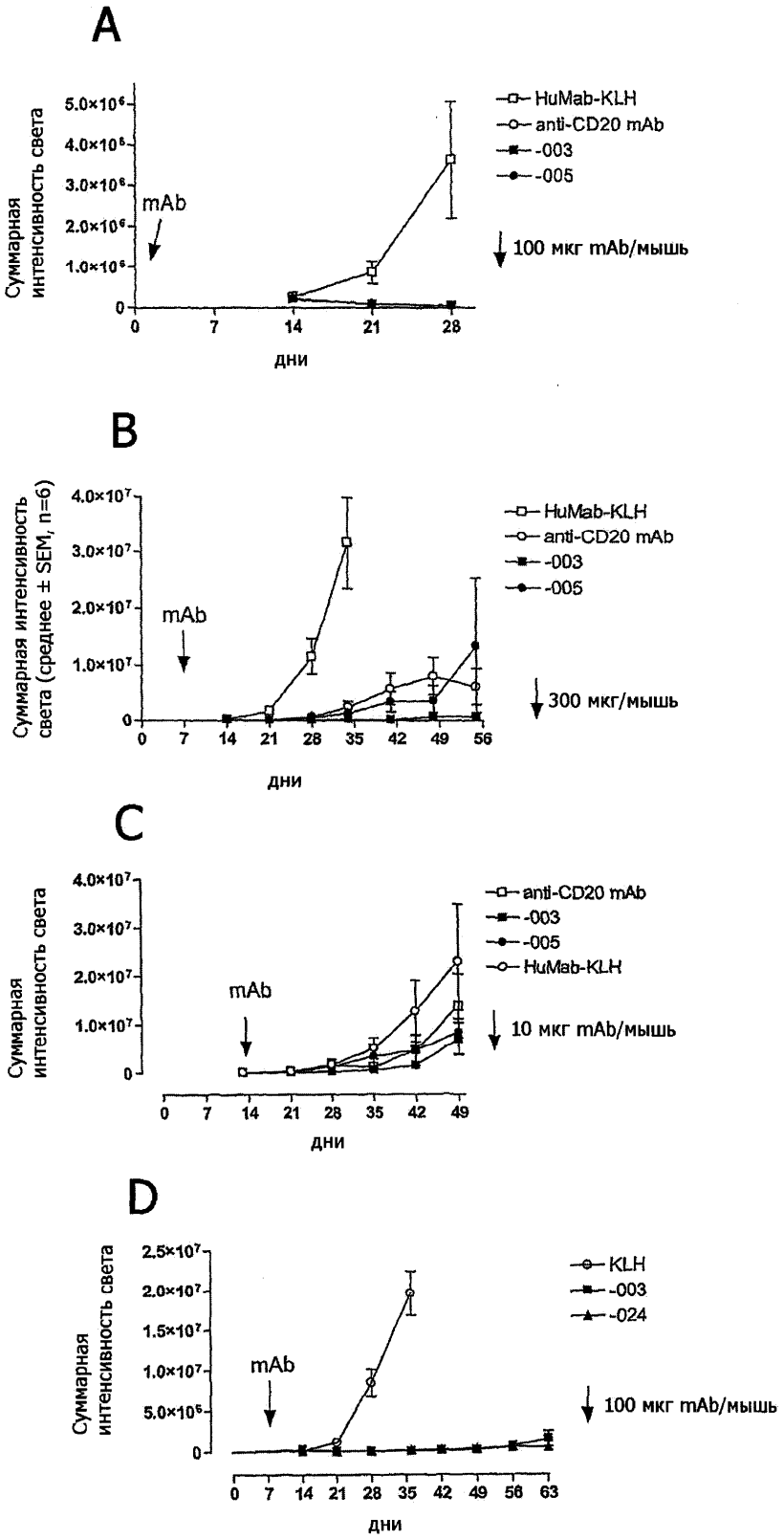

C
500
250
0
Флуоресценция FL1 (усл. ед.)
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
мкг/мл
-005
-003
HuMab-KLH

Фиг. 15

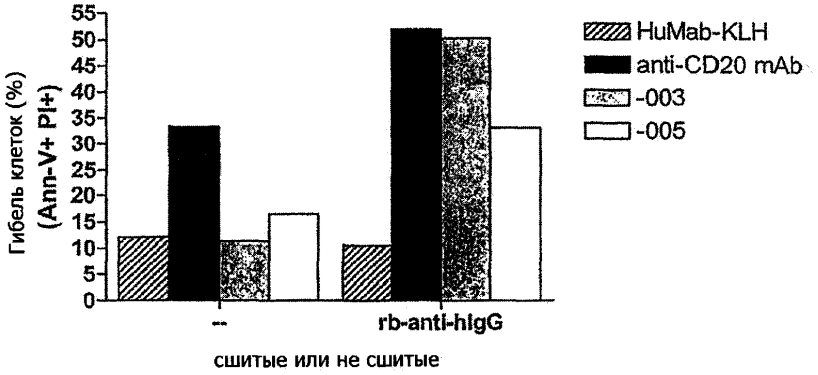

A
1000
800
600
400
200
0
Средняя флуоресценция
0
15
30
45
60
минуты
-003-FITC 4C
-003-FITC 37C


B
1200
1000
800
600
400
200
0
Средняя флуоресценция
0
15
30
45
60
минуты
-005-FITC 4C
-005-FITC 37C

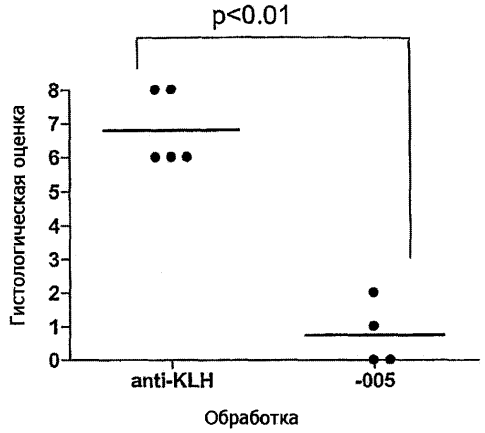
Фиг. 16


A
Суммарная интенсивность света
5.0×10⁶
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
mAb
0 7 14 21 28
дни
HuMab-KLH
anti-CD20 mAb
-003
-005
100 мкг mAb/мышь
B
Суммарная интенсивность света (среднее ± SEM, n=6)
4.0×10⁷
3.0×10⁷
2.0×10⁷
1.0×10⁷
0
mAb
0 7 14 21 28 35 42 49 56
дни
HuMab-KLH
anti-CD20 mAb
-003
-005
300 мкг/мышь
C
Суммарная интенсивность света
4.0×10⁷
3.0×10⁷
2.0×10⁷
1.0×10⁷
0
mAb
0 7 14 21 28 35 42 49
дни
anti-CD20 mAb
-003
-005
HuMab-KLH
10 мкг mAb/мышь
D
Суммарная интенсивность света
2.5×10⁷
2.0×10⁷
1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
mAb
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63
дни
KLH
-003
-024
100 мкг mAb/мышь

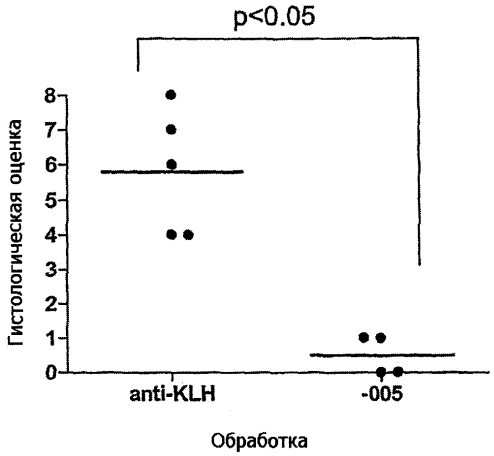
Фиг. 17



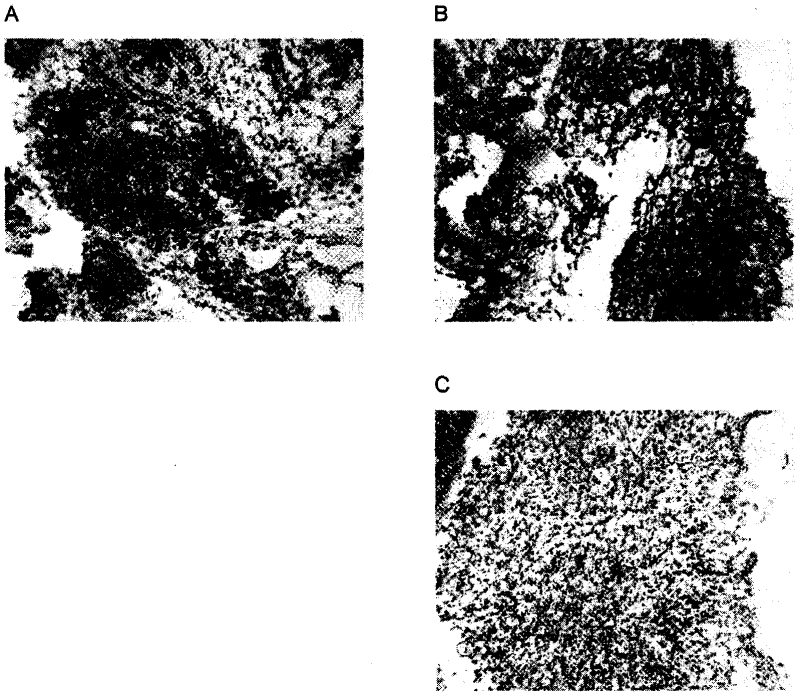
Фиг. 18



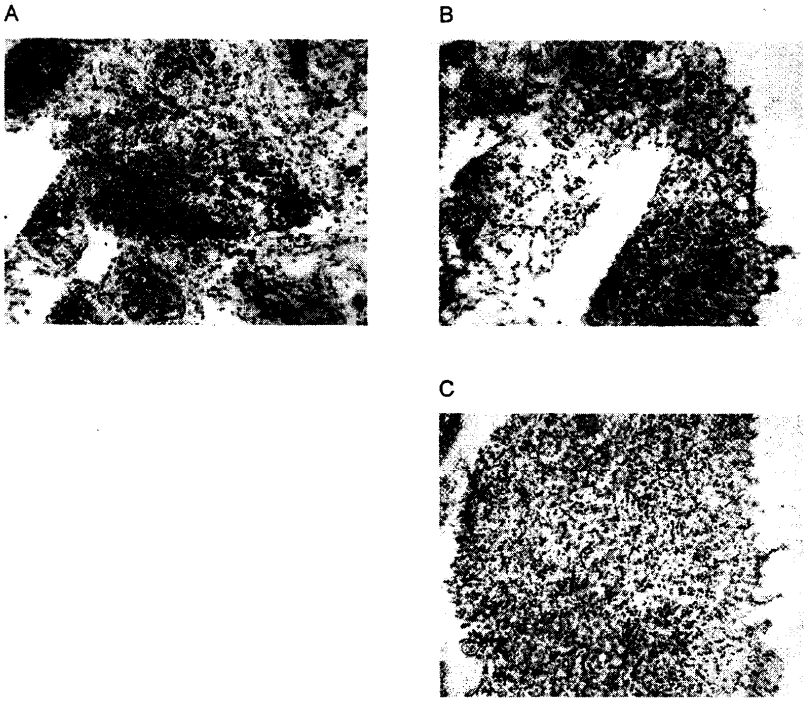
Фиг. 19



Фиг. 20

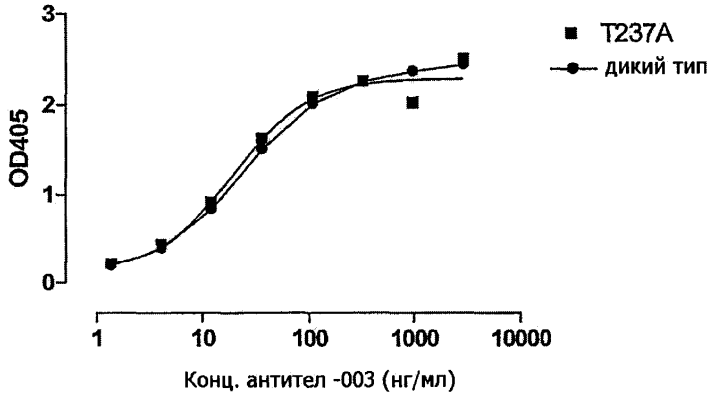


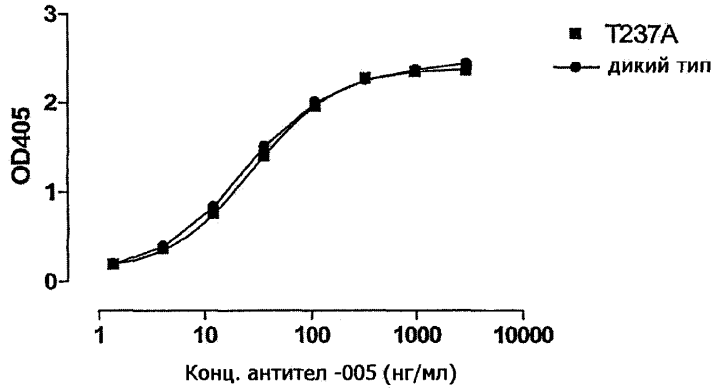
Фиг. 21



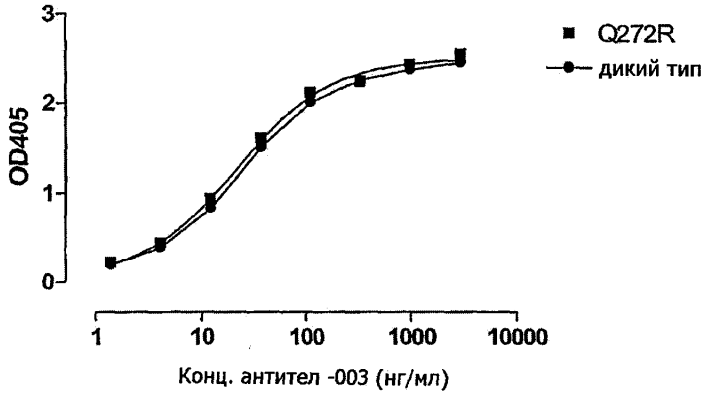
Фиг. 22

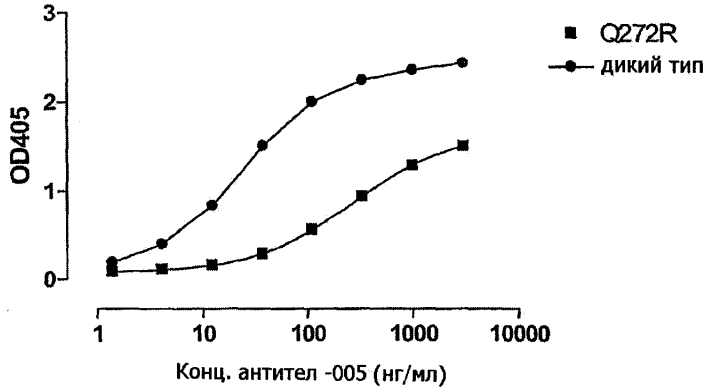
A:


3
2
1
0
OD405
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -003 (нг/мл)
T237A
дикий тип

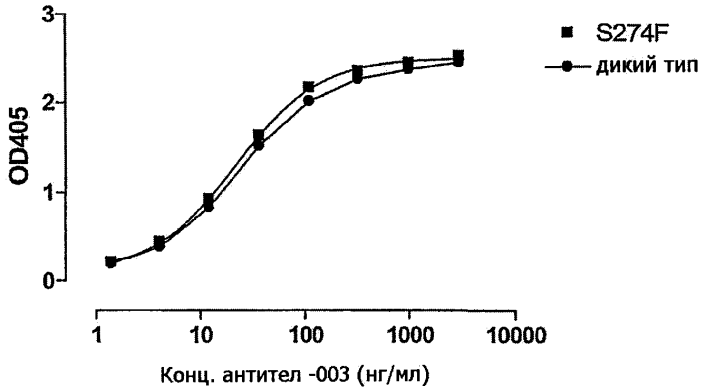

3
2
1
0
OD405
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -005 (нг/мл)
T237A
дикий тип

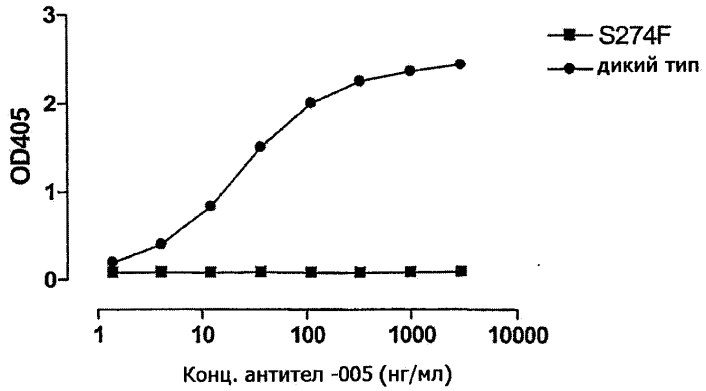
B:


3
2
1
0
OD405
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -003 (нг/мл)
Q272R
дикий тип

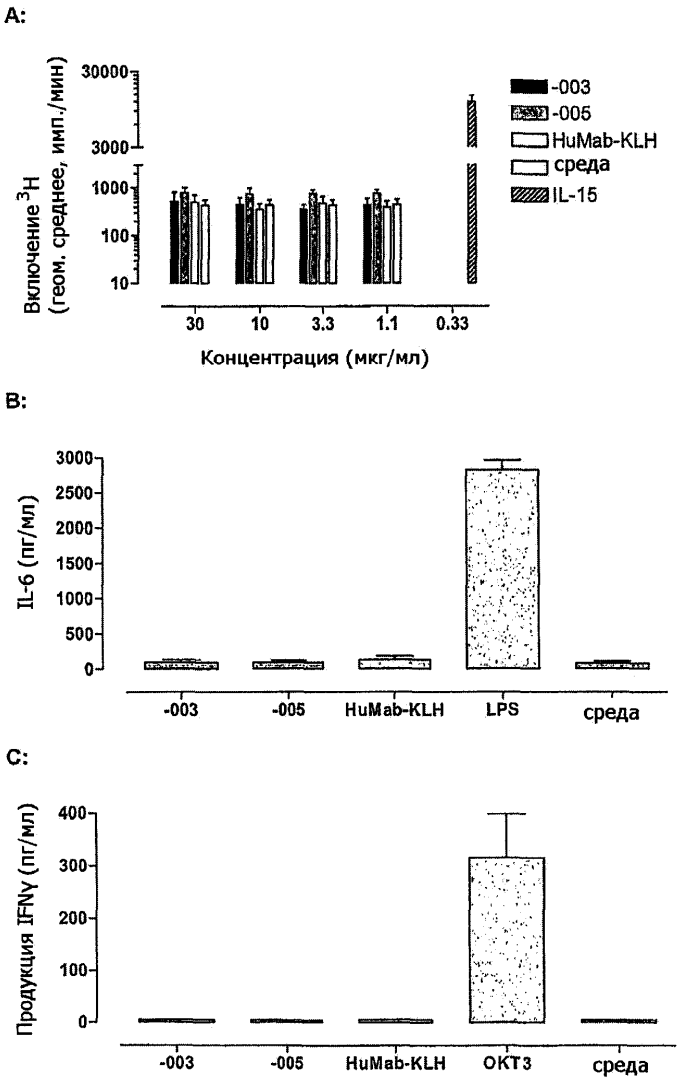

3
2
1
0
OD405
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -005 (нг/мл)
Q272R
дикий тип

C:


S274F
дикий тип
OD405
3
2
1
0
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -003 (нг/мл)

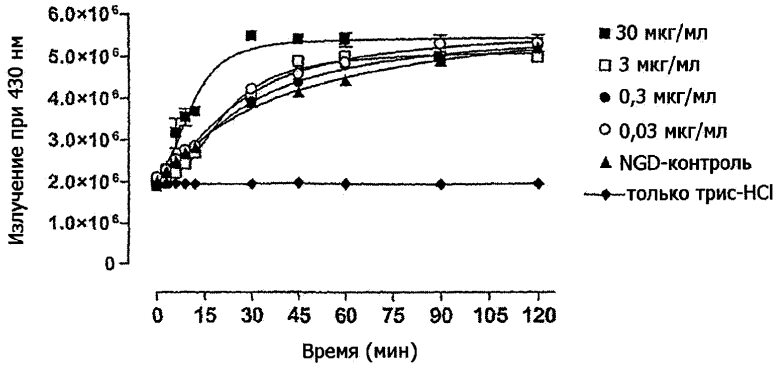

S274F
дикий тип
OD405
3
2
1
0
1
10
100
1000
10000
Конц. антител -005 (нг/мл)

Фиг. 23

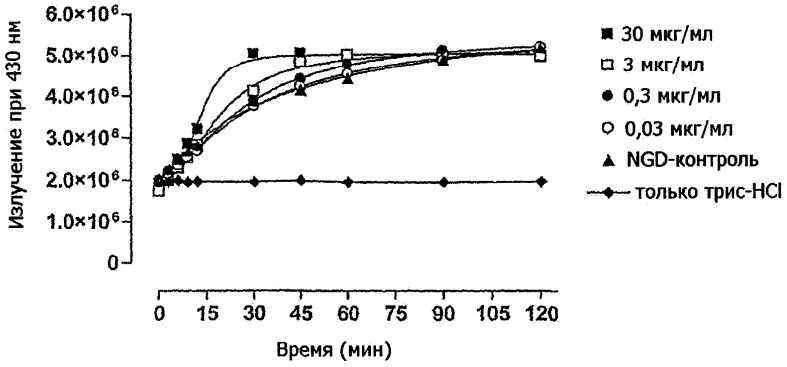

A:
Включение ^{3}H (геом. среднее, имп./мин)
30000
3000
1000
100
10
30
10
3.3
1.1
0.33
Концентрация (мкг/мл)
-003
-005
HuMab-KLH
среда
IL-15
B:
IL-6 (пг/мл)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-003
-005
HuMab-KLH
LPS
среда
C:
Продукция IFNγ (пг/мл)
400
300
200
100
0
-003
-005
HuMab-KLH
OKT3
среда

Фиг. 24

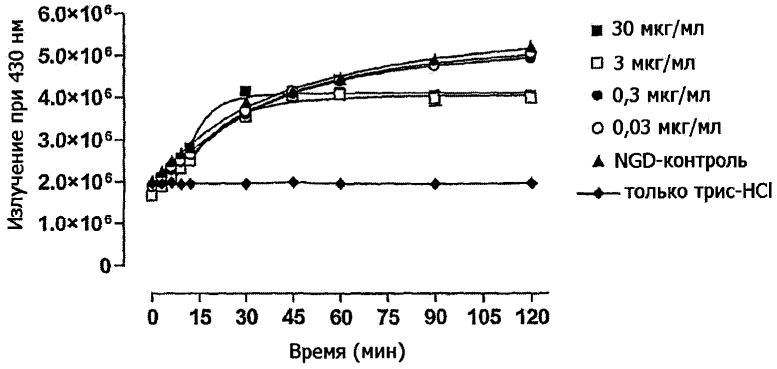
A


6.0×10⁶
5.0×10⁶
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
Излучение при 430 нм
0 15 30 45 60 75 90 105 120
Время (мин)
30 мкг/мл
3 мкг/мл
0,3 мкг/мл
0,03 мкг/мл
NGD-контроль
только трис-HCl

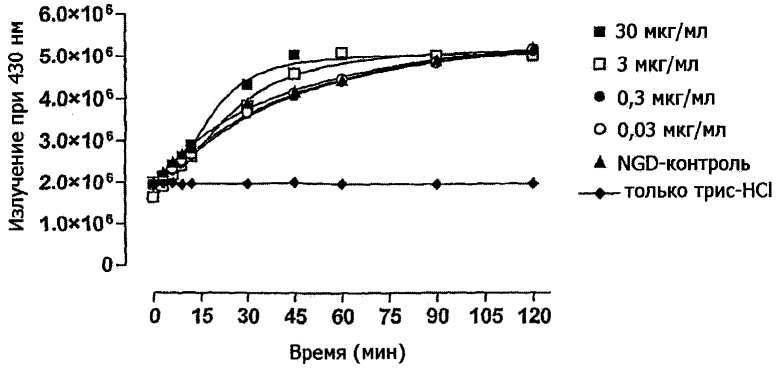
B


6.0×10⁶
5.0×10⁶
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
Излучение при 430 нм
0 15 30 45 60 75 90 105 120
Время (мин)
30 мкг/мл
3 мкг/мл
0,3 мкг/мл
0,03 мкг/мл
NGD-контроль
только трис-HCl

C

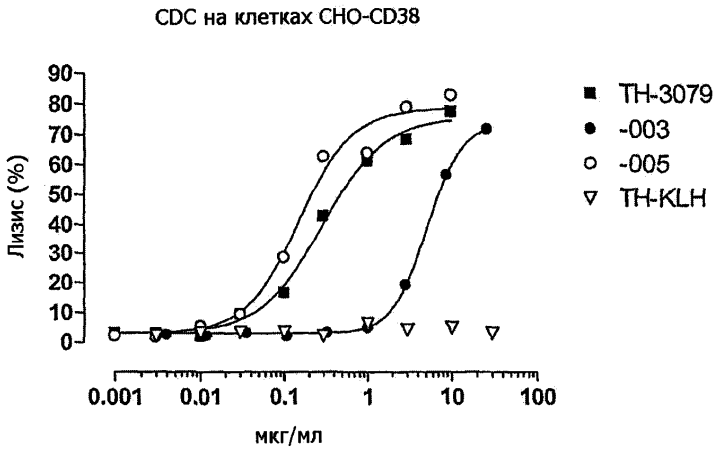

6.0×10⁶
5.0×10⁶
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
Излучение при 430 нм
0 15 30 45 60 75 90 105 120
Время (мин)
30 мкг/мл
3 мкг/мл
0,3 мкг/мл
0,03 мкг/мл
NGD-контроль
только трис-HCl

D

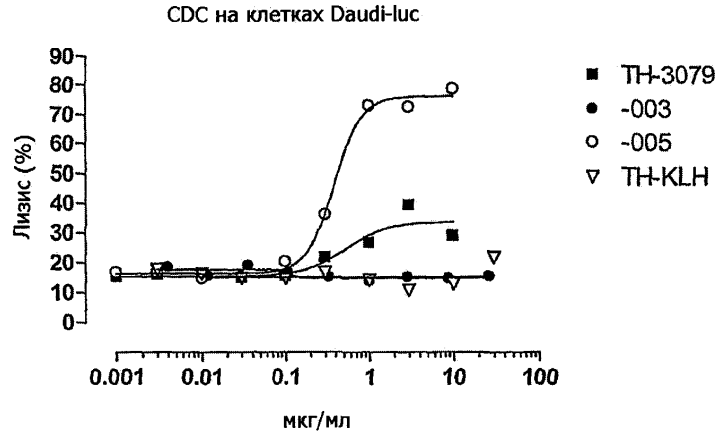

6.0×10⁶
5.0×10⁶
4.0×10⁶
3.0×10⁶
2.0×10⁶
1.0×10⁶
0
Излучение при 430 нм
0 15 30 45 60 75 90 105 120
Время (мин)
30 мкг/мл
3 мкг/мл
0,3 мкг/мл
0,03 мкг/мл
NGD-контроль
только трис-HCl

Фиг. 25

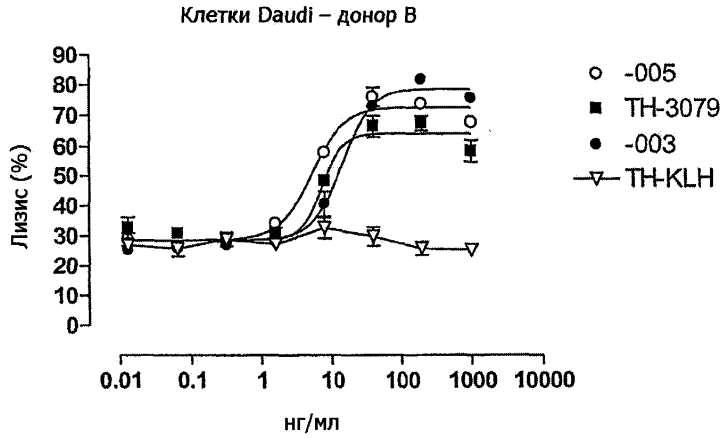
A


CDC на клетках CHO-CD38
Лизис (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
TH-3079
-003
-005
TH-KLH

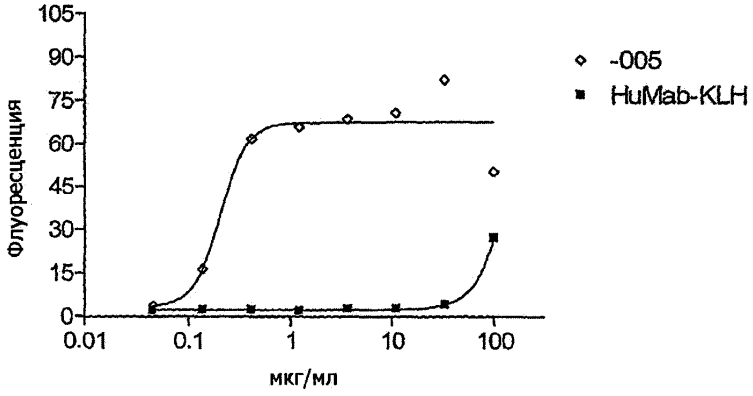
B


CDC на клетках Daudi-luc
Лизис (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
TH-3079
-003
-005
TH-KLH

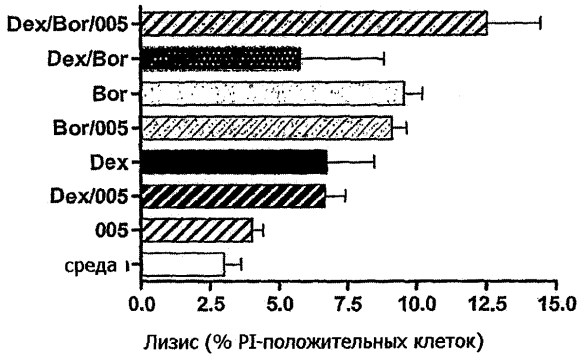
C


Клетки Daudi – донор B
Лизис (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нг/мл
-005
TH-3079
-003
TH-KLH

Фиг. 26


105
90
75
60
45
30
15
0
Флуоресценция
0.01
0.1
1
10
100
мкг/мл
-005
HuMab-KLH

Фиг. 27


Dex/Bor/005
Dex/Bor
Bor
Bor/005
Dex
Dex/005
005
среда
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
Лизис (% PI-положительных клеток)

Фиг. 28