

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035098**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.27

(21) Номер заявки
201690905

(22) Дата подачи заявки
2014.10.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ И/ИЛИ РЕФРАКТЕРНОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

(31) **61/898,309; 14306220.6**

(32) **2013.10.31; 2014.07.31**

(33) **US; EP**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/063380**

(87) **WO 2015/066450 2015.05.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Десланд Антуан, Гржегоржевски
Кржишжтоф Й., Озу Мари-лор,
Томкинсон Блейк (US)**

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

(56) CHILLEMI ANTONELLA ET AL.: "Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the functional characteristics of the target molecule", MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) 2013, vol. 19, May 2013 (2013-05), pages 99-108, XP002735274, ISSN: 1528-3658, page 105 - page 106

MARTIN THOMAS G. III ET AL.: "SAR650984, a CD38 Monoclonal Antibody In Patients With Selected CD38+Hematological Malignancies-Data From a Dose-Escalation Phase I Study", BLOOD, vol. 122, no. 21, November 2013 (2013-11), page 284, XP002735275, & 55TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; NEW ORLEANS, LA, USA; DECEMBER 07-10, 2013 the whole document

MARTIN T. ET AL.: "A PHASE IB DOSE ESCALATION TRIAL OF SAR650984 (ANTI-CD-38 MAB) IN COMBINATION WITH LENALIDOMIDE AND DEXAMETHASONE IN RELAPSED/REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA", HAEMATOLOGICA, vol. 99, no. Suppl. 1, June 2014 (2014-06), page 114, XP002735276, & 19TH CONGRESS OF THE EUROPEAN-HEMATOLOGY-ASSOCIATION; MILAN, ITALY; JUNE 12-15, 2014, ISSN: 0390-6078 paragraph
GOPALAKRISHNAN S. ET AL.: "Daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multidrug therapies", BLOOD AND LYMPHATIC CANCER: TARGETS AND THERAPY 20130107 DOVE MEDICAL PRESS LTD. NZL, vol. 3, 7 January 2013 (2013-01-07), pages 19-24, XP002735277, ISSN: 1179-9889, page 20 - page 23

RICHARDSON P. ET AL.: "Daratumumab. Anti-CD38 monoclonal antibody, treatment of multiple myeloma", DRUGS OF THE FUTURE 2013 PROUS SCIENCE ESP, vol. 38, no. 8, August 2013 (2013-08), pages 545-554, XP002735278, ISSN: 0377-8282, page 550

Sanofi: "Dose Escalation Study of Anti-CD38 Monoclonal Antibody in Patients With Selected CD38⁺ Hematological Malignancies", ClinicalTrials.gov archive, 15 October 2013 (2013-10-15), XP002735279, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01084252/2013_10_15 [retrieved on 2015-01-30] the whole document
WO-A2-2013059885

(57) Изобретение относится к способу лечения рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломы у человека, включающему введение человеку антитела, которое специфически связывается с CD38, в безопасной терапевтической дозе, где антитело содержит три последовательности CDR с SEQ ID NO: 13, 37 и 15 в тяжелой цепи и три последовательности CDR с SEQ ID NO: 16, 17 и 18 в легкой цепи.

035098 B1

035098 B1

Связанные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США № 61/898309, зарегистрированной 31 октября 2013 г., и европейской патентной заявке № EP 14306220.6, зарегистрированной 31 июля 2014 г., включенных в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме и для всех целей.

Список последовательностей

К настоящей заявке прилагается список последовательностей в машиночитаемой форме, точно воспроизводящий последовательности, представленные в настоящем описании.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к лечению заболевания с использованием антител. Более конкретно оно относится к применению антител против CD38 в качестве лекарственного средства или в получении лекарственного средства для лечения злокачественных новообразований, таких как множественная миелома.

Уровень техники

CD38 является трансмембранным гликопротеином типа II массой 45 кДа с длинным С-концевым внеклеточным доменом и коротким N-концевым цитоплазматическим доменом. Белок CD38 является бифункциональным экзоферментом, который может катализировать преобразование NAD⁺ в циклическую АДФ-рибозу (сADPR), а также гидролизовать сADPR в АДФ-рибозу.

CD38 повышен при многих гемобластозах и в клеточных линиях, полученных из различных гемобластозов. Кроме того, наиболее примитивные плюрипотентные стволовые клетки гематологической системы являются CD38⁺. Экспрессия CD38 при гемобластозах и ее корреляция с прогрессированием заболевания при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) делает CD38 привлекательной мишенью для терапии с использованием антител.

Антитела против CD38, специфически распознающие CD38, описаны ранее, например, в международной патентной заявке WO 2006/099875. Однако эти антитела не вызывают апоптоз при применении в качестве единственного средства и инкубации с CD38⁺-экспрессирующими клетками.

Специфические моноклональные антитела против CD38, такие как 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 и 38SB39, ранее описывали в международной патентной заявке WO 2008/047242. В WO 2008/047242 описывают три цитотоксические активности, апоптоз, ADCC и CDC, этих специфических антител против CD38.

Кроме того, применение этих специфических антител против CD38⁺ в комбинации с цитотоксическими средствами, такими как citarabin, винкристин, циклофосфамид и мелфалан, описывают в международных патентных заявках WO 2010/061357, WO 2010/061358, WO 2010/061359 и WO 2010/061360. Однако не описано применение антител против CD38 в качестве единственного средства.

Сущность изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителу, специфически связывающемуся с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело подлежит введению человеку в безопасной терапевтической дозе 20 мг/кг или менее.

В другом варианте осуществления безопасная терапевтическая доза описываемого антитела составляет приблизительно 5 мг/кг, или приблизительно 10 мг/кг, или приблизительно 20 мг/кг.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к антителу, специфически связывающемуся с CD38, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, специфически связывающееся с CD38, где антитело или фармацевтическую композицию можно использовать в качестве лекарственного средства в лечении рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломы, где антитело подлежит введению человеку в безопасной терапевтической дозе приблизительно 20 мг/кг или менее.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к применению антител против CD38 в качестве единственного средства, с помощью которого снижают дозу химиотерапевтических средств для пациента.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к безопасной терапевтической дозе антитела, специфически связывающегося с CD38, для человека, где указанная безопасная терапевтическая доза составляет 20 мг/кг или менее или приблизительно 20 мг/кг или менее.

В другом варианте осуществления изобретение также относится к способу лечения CD38⁺-гемобластоза у нуждающегося в этом человека, включающему введение указанному человеку антитела, специфически связывающегося с CD38, в безопасном терапевтически эффективном количестве 20 мг/кг или менее или приблизительно 20 мг/кг или менее.

В другом варианте осуществления изобретение также относится к способу лечения CD38⁺-множественной миеломы у нуждающегося в этом человека, включающему введение указанному человеку эффективного количества антитела, специфически связывающегося с CD38.

В другом варианте осуществления изобретение также относится к применению указанного антитела, специфически связывающегося с CD38, для производства лекарственного средства, где указанное антитело вводят человеку в безопасной терапевтической дозе 20 мг/кг или менее или приблизительно 20

мг/кг или менее.

В одном из вариантов осуществления лекарственное средство предназначено для лечения CD38⁺-гемобластоза, в частности множественной миеломы, в особенности рецидивирующей и/или рефрактерной CD38⁺-множественной миеломы.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению указанного антитела, специфически связывающегося с CD38, для производства лекарственного средства для лечения CD38⁺-множественной миеломы, в частности рецидивирующей и/или рефрактерной CD38⁺-множественной миеломы.

В одном из вариантов осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент не вызывает продукцию аутоантител против указанного антитела или эпитоп-связывающего фрагмента у человека при введении антитела или эпитоп-связывающего фрагмента человеку в дозе приблизительно 20 мг/кг или менее.

В другом варианте осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент способен проявлять детектируемую занятость рецепторов CD38 у человека при введении человеку на уровне дозы приблизительно 1 мг/кг каждые две недели.

В другом варианте осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент способен проявлять по меньшей мере приблизительно 84,1% занятости рецепторов CD38 у человека при введении человеку на уровне дозы приблизительно 10 мг/кг каждые две недели.

В другом варианте осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент способен проявлять по меньшей мере приблизительно 97,7% занятости рецепторов CD38 у человека при введении человеку на уровне дозы приблизительно 10 мг/кг каждые две недели.

В другом варианте осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент способен ингибировать рост опухоли у человека при введении человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг каждые две недели или каждую неделю.

В другом варианте осуществления описывают антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, способный специфически связываться с CD38, для применения в качестве лекарственного средства, где антитело или эпитоп-связывающий фрагмент способен ингибировать рост опухоли у человека при введении человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг каждые две недели или каждую неделю.

В другом варианте осуществления также описывают фармацевтическую композицию, содержащую любое из описываемых антител и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к стандартной лекарственной форме, содержащей фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании.

В другом варианте осуществления также настоящее изобретение относится к промышленному изданию, содержащему фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, и контейнер.

В другом варианте осуществления описываемые способы могут подходить для лечения человека, имеющего заболевание или нарушение, при котором CD38 аномально повышен. Такие способы могут включать, помимо прочих этапов, введение человеку антитела или его эпитоп-связывающего фрагмента, способного специфически связываться с CD38, где антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг каждые две недели или каждую неделю. В одном из аспектов такое заболевание или нарушение является CD38⁺-гемобластозом. В другом аспекте такое заболевание или нарушение является CD38⁺-множественной миеломой.

Краткое описание чертежа

На графике представлен ответ с течением времени у пациентов с множественной миеломой (N=17), которых подвергали лечению специфическим антителом против CD38 hu38SB19 в различных дозах (1, 3, 5 и 10 мг/кг) (некоторых пациентов исключали из исследования после краткого периода лечения по причине прогрессирования заболевания, однако нескольких пациентов стабилизировали в течение лечения, а другие на уровне доз 1 мг/кг и 10 мг/кг продемонстрировали частичный ответ; PR=частичный ответ, MR=минимальный ответ, SD=стабильное заболевание или PD=прогрессирующее заболевание).

Подробное описание

Как применяют в настоящем описании, термин "CD38" относится к белку CD38, являющемуся трансмембранным гликопротеином типа II массой 45 кДа с длинным С-концевым внеклеточным доме-

ном и коротким N-концевым цитоплазматическим доменом. Белок CD38 является бифункциональным экзоферментом, который может катализировать преобразование NAD⁺ в циклическую АДФ-рибозу (сADPR), а также гидролизует сADPR в АДФ-рибозу. В течение онтогенеза CD38 появляется на CD34⁺-коммитированных стволовых клетках и коммитированных в направлении дифференцировки предшественниках лимфоидных, эритроидных и миелоидных клеток. Экспрессия CD38 сохраняется, главным образом, в лимфоидном ростке с различными уровнями экспрессии на разных стадиях развития Т- и В-клеток.

Роль CD38⁺ в передаче сигнала дополнительно описывают в международной патентной заявке WO 2008/047242. В частности, CD38 относится к трансмембранному белку типа II, содержащему, например, аминокислотную последовательность, приведенную в Genbank под инвентарным номером NP_001766.2 (доступную на 7 октября 2013 г.).

CD38 повышающе регулируется при многих гемобластозах и в клеточных линиях, полученных из различных гемобластозов.

"Гемобласты" являются типами злокачественных новообразований, поражающих кровь, костный мозг и лимфоузлы. Поскольку они тесно связаны через иммунную систему, заболевание, поражающее одно из трех, также может поражать и другие. Гемобласты включают неходжкинскую лимфому (NHL) (включая, например, лимфому Беркитта (BL) и Т-клеточную лимфому (TCL)), множественную миелому (MM), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) (такой как, например, хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз (B-CLL) и волосатоклеточный лейкоз (HCL)), острый лимфоцитарный В- и Т-клеточный лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), лимфому Ходжкина (HL) и хронический миелолейкоз (CML).

С другой стороны, наиболее примитивные плюрипотентные стволовые клетки гематологической системы являются CD38⁻. Экспрессия CD38 при гемобластозах и ее корреляция с прогрессированием заболевания делает CD38 привлекательной мишенью для терапии с использованием антител.

"CD38⁺-клетка" является клеткой, экспрессирующей белок CD38. В частности, CD38⁺-клетка представляет собой клетку млекопитающего. В одном из вариантов осуществления CD38⁺-клетка является клеткой неходжкинской лимфомы (NHL), множественной миеломы (MM), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного В- и Т-клеточного лейкоза (ALL), острого миелолейкоза (AML), лимфомы Ходжкина (HL) или хронического миелолейкоза (CML), экспрессирующей белок CD38.

Таким образом, "CD38⁺-гемобластоз" является гемобластозом, как описано выше, где злокачественные клетки являются CD38⁺-клетками или включают их.

Как применяют в настоящем описании, CD38⁺-гемобластоз, в частности, выбран из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы (NHL) (включая, например, лимфому Беркитта (BL) и Т-клеточную лимфому (TCL)), множественную миелому (MM), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) (такой как, например, хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз (B-CLL) или волосатоклеточный лейкоз (HCL)), острый лимфоцитарный В- и Т-клеточный лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), лимфому Ходжкина (HL) и хронический миелолейкоз (CML), где злокачественные клетки являются CD38⁺-клетками или включают их.

В частности, CD38⁺-гемобластомами являются В-клеточная неходжкинская лимфома (NHL), множественная миелома (MM), острый миелолейкоз (AML), острый лимфоцитарный лейкоз (В-клеточный ALL) и/или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), более конкретно множественная миелома (MM), в особенности рецидивирующая и/или рефрактерная множественная миелома.

Способы идентификации гемобластога известны специалисту в этой области и включают в качестве первого этапа клинический анализ крови (CBC) и анализ мазка периферической крови. Для окончательного диагноза, как правило, необходима соответствующая пункция и/или биопсия костного мозга для морфологических исследований, впоследствии дополненная проточной цитометрией, цитогенетическим анализом и дополнительными молекулярными способами.

Способы подтверждения того, что клетки, полученные из этого гемобластога, являются CD38⁺, известны специалисту в этой области и включают стандартные способы молекулярной биологии, такие как, например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), и/или иммунохимические способы, такие как анализ вестерн-блоттинга.

Как применяют в настоящем описании, термин "индивидуум" означает человека.

В частности, в настоящем описании термин "индивидуум" и/или "нуждающийся в этом индивидууме" означает индивидуума, страдающего CD38⁺-гемобластозом и находящегося под медицинским наблюдением или на лечении. Таким образом, слово "индивидуум" в настоящем описании может означать пациента.

Индивидуум по изобретению может быть мужского или женского пола.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума ранее подвергали лечению с использованием противоопухолевой терапии. В частности, указанную выше противоопухолевую терапию можно выбирать из группы, состоящей из химиотерапии, таргетной терапии, лучевой терапии, трансплантации костного мозга и/или стволовых клеток и иммунотерапии.

Термин "химиотерапия" относится к лечению злокачественного новообразования с использованием одного или нескольких цитотоксических противоопухолевых лекарственных средств (химиотерапевтических лекарственных средств) как части стандартизированной схемы лечения. Как правило, химиотерапевтическое лекарственное средство вводят циклами, где за периодом лечения следует период покоя, чтобы дать организму время для восстановления.

"Химиотерапевтическими лекарственными средствами", используемыми, например, для лечения гемобластоза, являются в качестве неограничивающих примеров цитарабин (цитозинарабинозид или ага-С) и антрациклиновые лекарственные средства (такие как даунорубин и/или дауномицин, доксорубин и липосомальный доксорубин, идарубин и митоксантрон), гемтузумаб, клофарабин, кладрибин, гидроксимочевина (hydreа®), эпозид, амсакрин, FLT3-ингибиторы и деметилирующие средства (5-азациитидин и децитабин), мелфалан, циклофосфамид, винкристин, ингибиторы протеасом, такие как бортезомиб, леналидомид, талидомид и/или помалидомид, в частности бортезомиб и/или леналидомид.

Термин "таргетная терапия" относится к лекарственным средствам или другим веществам, блокирующим рост и распространение злокачественного новообразования, противодействуя конкретным молекулам, участвующим в росте и прогрессировании опухоли.

В "лучевой терапии" или "облучении" используют излучение высокой энергии для удаления злокачественных клеток. Лучевую терапию можно использовать перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток периферической крови.

Термин "трансплантация костного мозга и/или стволовых клеток" относится к трансплантации клеток, целью которой является восстановление стволовых клеток, разрушенных высокими дозами химиотерапии и/или лучевой терапии. Источники стволовых клеток включают костный мозг, периферическую кровь или пуповинную кровь. В зависимости от источника стволовых клеток, подвергаемых трансплантации, способ может отличаться при трансплантации костного мозга (ВМТ), или трансплантации стволовых клеток периферической крови (PBSCT), или трансплантации пуповинной крови (UCBT). Кроме того, трансплантация костного мозга и/или стволовых клеток может относиться к трансплантации аутологичных стволовых клеток и/или аллогенной трансплантации.

При "аутологичной трансплантации" стволовые клетки самого индивидуума удаляют из его или ее костного мозга или периферической крови. Их замораживают и хранят пока индивидуума подвергают лечению (высокими дозами химиотерапии и/или излучения). В попытке удалить любые лейкозные клетки в образцах можно использовать способ под названием "десенсибилизация". Затем стволовые клетки реинфузируют в кровь индивидуума после лечения.

"Аллогенными трансплантатами" являются трансплантаты от совместимого донора. Преимуществом аллогенных трансплантатов костного мозга является то, что трансплантируемые клетки от донора могут основывать новую иммунную систему, которая может распознавать лейкозные клетки как чужеродные и удалять их. Недостатком аллогенных трансплантатов является ограничение по совместимым донорам и побочные эффекты.

"Иммунотерапия" относится к стимуляции иммунной системы индивидуума для атаки злокачественных опухолевых клеток, ответственных за заболевание. Это можно осуществлять посредством иммунизации индивидуума, например посредством введения противораковой вакцины, в случае чего иммунная система самого индивидуума обучается распознавать опухолевые клетки как мишени для разрушения, или посредством введения терапевтических антител в качестве лекарственных средств, в случае чего иммунная система индивидуума рекрутируется для разрушения опухолевых клеток с помощью терапевтических антител.

Как применяют в настоящем описании, индивидуума ранее могли подвергать лечению гемобластоза посредством стандартной противоопухолевой терапией, как определено выше, но он является рецидивирующим и/или рефрактерным.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления индивидуум страдает CD38⁺-множественной миеломой, в частности рецидивирующей и/или рефрактерной CD38⁺-множественной миеломой.

Термин "рецидивирующий" относится к индивидууму, у которого гемобластоз подвергают лечению и улучшают, но у которого гемобластоз рецидивирует.

Термин "рефрактерный" относится к индивидууму, у которого гемобластоз подвергают лечению, но без улучшения, и, таким образом, гемобластоз прогрессирует.

В одном из вариантов осуществления индивидуума ранее подвергали лечению бортезомибом и/или леналидомидом.

В одном из вариантов осуществления индивидууму ранее проводили трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT).

В одном из вариантов осуществления индивидуум имеет рецидив в течение 6 месяцев после аутологичной трансплантации.

В этой области известно, что у индивидуумов, имеющих множественную миелому и конкретные генетические признаки, такие как хромосомная делеция 17p, транслокации t(4,14), t(14,16), t(14,20) или амплификации, такие как наличие >3 копий 1q21, наблюдают более неблагоприятный исход.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления индивидуум имеет делецию 17p, t(4,14),

t(14,16), t(14,20) и/или >3 копий 1q21.

Недавно исследователи разработали тест геномного профилирования для индивидуумов с множественной миеломой. Этот тест позволяет врачам классифицировать индивидуумов с множественной миеломой на основе их геномного профиля экспрессии, а не только по нескольким хромосомным аномалиям.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления индивидуум может иметь сигнатуру профиля генной экспрессии (GEP) с высоким риском (Shaughnessy J.D. Jr., Zhan F., Burington B.E., et al. (2007), Blood 109: 2276-2284.).

Индивидуум может иметь любую комбинацию указанных выше признаков.

Множественную миелому можно определять по наличию моноклональных белков (М-белков).

"М-белок" относится к парапротеину (моноклональному белку или М-белку). Этот парапротеин является иммуноглобулином или легкой цепью иммуноглобулина, избыточно продуцирующимся при клональной пролиферации плазматических клеток. Количества выше конкретного порогового значения свидетельствуют о множественной миеломе. М-белок, как правило, количественно анализируют в сыворотке, а также в моче.

Уровень М-белка в сыворотке, как правило, измеряют посредством электрофореза сыворотки или, например, специфических анализов иммуноглобулинов; однако при конкретном количественном анализе иммуноглобулинов всегда завышают значения М-белка, т.к. результат включает нормальные иммуноглобулины. По этой причине исходное и последующие измерения М-белка необходимо осуществлять одним и тем же способом (Riches P.G. et al., 1991).

В одном из вариантов осуществления М-белок в сыворотке >0,5 г/дл свидетельствует о множественной миеломе. В другом варианте осуществления М-белок в сыворотке больше приблизительно 0,5 г/дл свидетельствует о множественной миеломе.

М-белок в моче относится к М-белку, экскретируемому с мочой, измеряемому в течение 24 ч. Общее количество белка экскретируемого в течение 24 ч, как правило, измеряют и умножают на значение процентной доли М-белка в моче, определяемого посредством электрофореза концентрированного белка мочи.

В одном из вариантов осуществления М-белок в моче >200 мг в моче в течение 24 ч свидетельствует о множественной миеломе. В другом варианте осуществления М-белок в моче больше приблизительно 200 мг в моче в течение 24 ч свидетельствует о множественной миеломе.

Множественную миелому дополнительно можно определять по легкой цепи иммуноглобулина, обнаруживаемой в моче, этот парапротеин называют белком Бенс-Джонса, и он является парапротеином мочи, состоящим из свободных легких цепей, где легкие цепи являются свободными лямбда- (λ) и/или каппа- (κ) легкими цепями. Эти свободные легкие цепи (FLC) можно измерять с помощью коммерческих тестов. Измерение свободных легких цепей относится к измерению свободных легких цепей FLC- κ и FLC- λ , с помощью которого получают соотношение легкой цепи (FLC) FLC- κ и FLC- λ (соотношение FLC κ/λ), где нормальное соотношение FLC κ/λ находится в диапазоне от 0,26 до 1,65.

У пациентов с множественной миеломой могут доминантно продуцироваться любые из легких цепей, κ или λ , что приводит к изменениям соотношения FLC κ/λ .

Таким образом, аномальными соотношениями FLC κ/λ , свидетельствующими о множественной миеломе, являются соотношения FLC κ/λ , <0,26 или >1,65.

В одном из вариантов осуществления повышенные свободные легкие цепи (FLC) в сыворотке с FLC >10 мг/дл и с аномальным соотношением FLC свидетельствуют о множественной миеломе. В другом варианте осуществления повышенные свободные легкие цепи (FLC) в сыворотке с FLC больше приблизительно 10 мг/дл и с аномальным соотношением FLC свидетельствуют о множественной миеломе.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления индивидуум, имеющий множественную миелому, имеет а) измеряемый М-белок сыворотки более приблизительно 0,5 г/дл, и/или б) М-белок мочи более приблизительно 200 мг (в моче в течение 24 ч), и/или с) повышенные свободные легкие цепи в сыворотке (FLC) с FLC более приблизительно 10 мг/дл с аномальным соотношением FLC.

В одном из вариантов осуществления индивидуум толерантен к инфузируемым белковым продуктам.

В контексте изобретения антитело специфически связывается с CD38. По варианту осуществления антитела против CD38, подлежащие использованию в рамках изобретения, способны уничтожать CD38⁺-клетку посредством индукции апоптоза, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Как применяют в настоящем описании, термин "апоптоз" относится к процессу программируемой гибели клеток.

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность" или "ADCC" относится к механизму клеточно-опосредованной иммунной защиты, посредством которой эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует клетку-мишень, поверхностные антигены на мембране которой связаны специфическими антителами.

Как применяют в настоящем описании, термин "комплементзависимая цитотоксичность" или

"CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии белков системы комплемента.

Как применяют в настоящем описании, термины "конъюгат", "иммуноконъюгат", "конъюгат антители-лекарственное средство" или "ADC" имеют одинаковое значение, и их используют взаимозаменяемо.

"Антитело" может являться природным или общепринятым антителом, в котором две тяжелые цепи соединены друг с другом дисульфидными связями и каждая тяжелая цепь соединена дисульфидной связью с легкой цепью. Существует два типа легкой цепи, лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов (или изоформ) тяжелых цепей, определяющих функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит отдельные домены последовательности. Легкая цепь включает два домена или области, варибельный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает четыре домена, варибельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, в совокупности обозначаемых как CH). Варибельные области легких (VL) и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание связывания и специфичность к антигену. Домены константной области легких (CL) и тяжелых (CH) цепей придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антитела, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент является N-концевой частью Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из варибельных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела присуща структурной комплементарности между антигенсвязывающим участком антитела и антигенной детерминантой. Антигенсвязывающие участки антитела состоят из остатков, главным образом, из гиперварибельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Иногда, остатки из негиперварибельных или каркасных областей (FR) влияют на общую структуру домена и, таким образом, на антигенсвязывающий участок.

Термин "определяющие комплементарность области" или "CDR" относится к аминокислотным последовательностям, в совокупности определяющим аффинность связывания и специфичность природной области Fv нативного участка связывания иммуноглобулина. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина содержит три CDR, обозначаемых как CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H соответственно. Таким образом, общепринятый антигенсвязывающий участок антитела включает шесть CDR, содержащих набор CDR из каждой из V-областей тяжелой и легкой цепи.

Термин "каркасные области" (FR) относится к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR, т.е. частям варибельных областей легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина, являющимся относительно консервативными среди разных иммуноглобулинов у одного вида. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов содержит четыре FR, обозначаемых как FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H соответственно.

Как применяют в настоящем описании, "каркасная область человека" является каркасной областью, по существу, идентичной (приблизительно на 85% или более, в частности 90, 95, 97, 99 или 100%) каркасной области природного антитела человека.

Определение CDR/FR, касающееся легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, основано на определении по Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело" обозначает общепринятые антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в частности варибельную область тяжелой цепи однодоменных антител, и химерные, гуманизированные, биспецифические или полиспецифические антитела.

Как применяют в настоящем описании, антитело или иммуноглобулин также включает "однодоменные антитела", недавно описанные и являющиеся антителами, определяющие комплементарность области которых являются частью однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают антитела, состоящие из тяжелых цепей, антитела, от природы лишённые легких цепей, однодоменные антитела, полученные из общепринятых четырехцепочечных антител, сконструированные однодоменные антитела. Однодоменные антитела можно получать из любого вида, включая в качестве неограничивающих примеров, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика и крупный рогатый скот.

Однодоменные антитела могут являться природными однодоменными антителами, известными как антитела, состоящие из тяжелых цепей, лишённые легких цепей. В частности, виды Camelidae, например верблюд, дромадер, лама, альпака и гуанако, продуцируют антитела, состоящие из тяжелых цепей, от природы лишённые легкой цепи. В антителах верблюжьих, состоящих из тяжелых цепей, также отсутствует домен CH1.

Варибельная область тяжелой цепи этих однодоменных антител, лишённых легких цепей, известна в этой области как "VHH" или "нанотело". Аналогично общепринятым доменам VH, VHH содержат четыре FR и три CDR. Нанотела обладают преимуществами по сравнению с общепринятыми антителами: они приблизительно в десять раз меньше молекул IgG, и, как следствие, правильно свернутые функциональные нанотела можно получать посредством экспрессии *in vitro*, одновременно достигая высокого выхода. Кроме того, нанотела являются очень стабильными и устойчивыми к действию протеаз. Обзор свойств и получения нанотел представлен Harmsen и De Haard (Harmsen and De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22).

Как применяют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело" или "mAb" относится к

молекуле антитела одной композиции аминокислот, направленной против конкретного антигена, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

Моноклональное антитело можно получать с помощью одного клона В-клеток или гибридомы, но оно также может являться рекомбинантным, т.е. получаемым с помощью белковой инженерии.

Термин "химерное антитело" относится к сконструированному антителу, в котором константную область или его часть изменяют или заменяют таким образом, что переменную область соединяют с константной областью другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител. Химерное антитело также относится к антителу, в котором переменная область или его часть изменяют или заменяют таким образом, что константную область соединяют с переменной областью другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител. В частности, химерное антитело содержит домен VH и домен VL антитела, полученный из не принадлежащего человеку животного, соединенный с доменом CH и доменом CL другого антитела, в частности антитела человека. В качестве не принадлежащего человеку животного можно использовать любое животное, такое как мышь, крыса, хомяк, кролик или т.п. Химерное антитело также может означать полиспецифическое антитело, имеющее специфичность по меньшей мере к двум разным антигенам. В варианте осуществления химерное антитело имеет переменные домены мышинового происхождения и константные домены человеческого происхождения.

Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, исходно полностью или частично не принадлежащему человеку и модифицированному для замены конкретных аминокислот, в частности в каркасных областях тяжелых и легких цепей, во избежание или для минимизации иммунного ответа у людей. Константные домены гуманизованного антитела в большинстве случаев являются доменами CH и CL человека. В варианте осуществления гуманизованное антитело имеет константные домены человеческого происхождения.

В случае химерных антител гуманизация, как правило, включает модификацию каркасных областей последовательностей переменной области.

Аминокислотные остатки, являющиеся частью CDR, как правило, не будут изменять применительно к гуманизации, хотя в конкретных случаях желательным может являться изменение отдельных аминокислотных остатков CDR, например, для удаления участка гликозилирования, участка дезамидирования, нежелательного остатка цистеина, остатка лизина в случае ADC. N-связанное гликозилирование происходит посредством присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в последовательности трипептида Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может являться любой аминокислотой, за исключением Pro. Удаление N-участка гликозилирования можно осуществлять посредством мутагенеза остатка Asn, или Ser, и/или Thr в другой остаток, в частности, посредством консервативной аминокислотной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамина может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и экспонирование поверхности. Остатки аспарагина особенно восприимчивы к дезамидированию, главным образом, при наличии в последовательности Asn-Gly и, в меньшей степени, в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Если такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, то, таким образом, желательным может являться удаление участка, как правило, посредством консервативной замены для удаления одного из вовлеченных остатков. В случае ADC прикрепление цитотоксического средства к mAb можно осуществлять посредством ковалентного присоединения к боковой цепи остатка лизина. Это стерическое препятствие может мешать связыванию mAb с антигеном. Таким образом, желательным может являться удаление остатка лизина, как правило, посредством консервативной замены аргинином. Замена в последовательности CDR для удаления одного из вовлеченных остатков также предназначена для включения в настоящее описание.

Целью гуманизации является снижение иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышинное антитело, для введения человеку при одновременном поддержании полной аффинности связывания антигена и специфичности антитела. Гуманизованные антитела или антитела, адаптированные для неотторжения другими млекопитающими, можно получать с использованием нескольких технологий, таких как изменение поверхности и CDR-графтинг. Как применяют в настоящем описании, в технологии изменения поверхности используют комбинацию молекулярного моделирования, статистического анализа и мутагенеза для изменения поверхностей не-CDR переменных областей антитела для того, чтобы делать их похожими на поверхности известных антител целевого хозяина.

Стратегии и способы изменения поверхности антител и другие способы снижения иммуногенности антител в другом хозяине описывают в патенте США № 5639641.

В кратком изложении, в предпочтительном способе

(1) для получения набора поверхностно-экспонированных положений каркаса переменной области тяжелых и легких цепей осуществляют выравнивание положений совокупности переменных областей тяжелых и легких цепей антител, где выровненные положения для всех переменных областей являются по меньшей мере на приблизительно 98% идентичными;

(2) для антитела грызуна (или его фрагмента) определяют набор поверхностно-экспонированных аминокислотных остатков каркаса переменной области тяжелых и легких цепей;

(3) идентифицируют набор аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелых и легких цепей, наиболее близко идентичных набору поверхностно-экспонированных аминокислотных остатков грызуна;

(4) набор аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелых и легких цепей, определенный на этапе (2), заменяют набором аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелых и легких цепей, идентифицированным на этапе (3), за исключением аминокислотных остатков, находящихся в пределах 5 Å от любого атома любого остатка определяющих комплементарность областей антитела грызуна; и

(5) получают гуманизованное антитело грызуна, имеющее специфичность связывания. Таким образом, в одном из вариантов осуществления гуманизованные антитела также можно обозначать как антитела "с измененной поверхностью".

Антитела можно дополнительно гуманизовать с использованием множества других способов, включая CDR-графтинг (EP 0239400; WO 91/09967; патенты США №№ 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 0592106; EP 0519596; Padlan (1991) *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:969-973) и перестановку цепей (патент США № 5565332). Антитела человека можно получать множеством известных в этой области способов, включая способы фагового дисплея. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111, 5545806 и 5814318 и международные патентные заявки WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

"Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена, по существу, не меняет функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают:

- 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;
- 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин;
- 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;
- 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;
- 6) кислые боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота;
- 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин-триптофан, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

"Фрагменты" (общепринятых) антител содержат часть интактного антитела, в частности антигенсвязывающую область или варибельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab)₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифические и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагментом общепринятого антитела также может являться однодоменное антитело, такое как антитело, состоящее из тяжелых цепей, или VHH.

Термин "Fab" означает фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 50000 Да и антигенсвязывающую активность, в котором приблизительно половина N-концевой части H-цепи и целая L-цепь соединены дисульфидной связью, получаемый среди фрагментов, получаемых при обработке IgG протеазой папаином.

Термин "F(ab')₂" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу приблизительно 100000 Да и антигенсвязывающую активность, являющемуся немного более крупным, чем Fab, соединенному дисульфидной связью в шарнирной области, получаемому среди фрагментов, получаемых при обработке IgG протеазой пепсином.

Термин "Fab'" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу приблизительно 50000 Да и антигенсвязывающую активность, получаемому расщеплением дисульфидной связи шарнирной области F(ab')₂-фрагмента.

Одноцепочечный полипептид Fv ("scFv") является ковалентно связанным гетеродимером VH::VL, как правило, экспрессирующимся со слитого гена, включающего гены, кодирующие VH и VL, соединенные пептид-кодирующим линкером. Фрагмент scFv человека по изобретению включает CDR, поддерживаемую в соответствующей конформации, в частности, с использованием способов генетической рекомбинации. Бивалентные и поливалентные фрагменты антител могут образовываться спонтанно посредством ассоциации моновалентных scFv, или их можно получать, соединяя моновалентные scFv с помощью пептидного линкера, такие как бивалентные sc(Fv)₂.

"dsFv" является гетеродимером VH::VL, стабилизированным дисульфидной связью.

Термин "(dsFv)₂" означает два dsFv, соединенных пептидным линкером.

Термин "биспецифическое антитело" или "BsAb" означает антитело, в котором комбинируют антигенсвязывающие участки двух антител в одной молекуле. Таким образом, BsAb способны связываться с двумя разными антигенами одновременно. Для дизайна, модификации и получения антител или производных антител с желаемым набором связывающих свойств и эффекторных функций все чаще исполь-

зуют генетическую инженерию, как описано, например, в EP 2050764 A1.

Термин "полиспецифическое антитело" означает антитело, в котором комбинируют антигенсвязывающие участки двух или более антител в одной молекуле.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, содержащим варибельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с варибельным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). Используя линкер, слишком короткий для образования пары между двумя доменами на одной цепи, домены заставляют образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и получают два антигенсвязывающих участка.

Антитело для применения по настоящему изобретению может являться одним из моноклональных антител против CD38, обозначаемых как 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 и 38SB39, описываемых в WO 2008/047242, или их производными, получаемыми с помощью технологии изменения поверхности.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 2 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 3, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 4, 5 и 6. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 44 и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 38.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 8 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 9, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 10, 11 и 12. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 45, и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 39.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 13, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 15, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 16, 17 и 18. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 46, и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 40.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 19, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 20 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 21, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 22, 23 и 24. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 47, и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 41.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 25, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 27, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28, 29 и 30. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 48, и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 42.

В частности, антитело против CD38 в контексте настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 31, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую три последовательных CDR, имеющих аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 34, 35 и 36. В частности, указанное антитело имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 49, и варибельный домен легкой цепи, содержащий цепь SEQ ID NO: 43.

Настоящее изобретение дополнительно включает антитела, содержащие последовательность, по меньшей мере на 85%, более конкретно по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательностям, представленным в настоящем описании.

Последовательность, "по меньшей мере на 85% идентичная референсной последовательности", является последовательностью, имеющей по всей своей длине 85% или более, в частности 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности по отношению ко всей длине референсной последовательности.

Процентную долю "идентичности последовательности" можно определять посредством сравнения двух последовательностей, оптимально выровненных в пределах окна сравнения, где часть последовательности полинуклеотида или полипептида в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е.

пропуски) по сравнению с референсной последовательностью (не содержащей вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную долю вычисляют, определяя количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, разделяя количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножая результат на 100 для получения процентной доли идентичности последовательности. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания осуществляют посредством глобального попарного выравнивания, например, с использованием алгоритма по Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). Процентную долю идентичности последовательности легко можно определять, например, с использованием программы Needle с матрицей BLOSUM62 и следующими параметрами: штраф за открытие пропуска = 10, штраф за увеличение пропуска = 0,5.

В одном из вариантов осуществления антитела против CD38 являются гуманизированными антителами против CD38, получаемыми с помощью технологии изменения поверхности. Такие антитела также можно называть антителами "с измененной поверхностью".

В одном из вариантов осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированная версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

В другом варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированная версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 10, 11 и 12.

В другом варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированная версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13, 37 и 15, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18.

В другом варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированная версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 19, 20 и 21, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 22, 23 и 24.

В другом варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированная версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 28, 29 и 30.

В дополнительном варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированной версия антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34, 35 и 36.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам с измененной поверхностью и/или гуманизированным антителам, содержащим VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 50 и 51. В дополнительном варианте осуществления версия с измененной поверхностью и/или гуманизированной версия антитела содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В другом варианте осуществления гуманизированная версия антитела содержит VH имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, содержащим VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 52, 53, 54 и 55. В другом варианте осуществления гуманизированная версия антитела содержит VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 52 и 53. В другом варианте осуществления гуманизированная версия антитела содержит VL, имеющую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 54 и 55.

В конкретном варианте осуществления антитело по изобретению является гуманизированным анти-телом и/или антителом с измененной поверхностью, обозначаемым как hu38SB19, содержащим VH, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, и содержащую VL, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению является даратумумабом.

В конкретном варианте осуществления антитело для применения по изобретению является выделенным антителом, т.е. оно не соединено с каким-либо лекарственным средством для образования конъюгата антитело-лекарственное средство.

Антитела для применения по изобретению специфически связываются с CD38 и способны уничтожать CD38⁺-клетку посредством индукции апоптоза, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В конкретном варианте осуществления антитела для применения по изобретению способны уничтожать CD38⁺-клетку *in vitro* посредством индукции апоптоза, даже если клетки, обработанные антителом, не являются поперечно-сшитыми с вторичным антителом против IgG человека.

Настоящее изобретение дополнительно включает гуманизированные антитела, содержащие последовательность, по меньшей мере на 85%, более конкретно по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательностям, представленным в настоящем описании выше.

Антитела по изобретению можно получать стандартными способами иммунизации животного, получения гибридомы и селекции антител с конкретными характеристиками. В частности, антитело против CD38 38SB19 получают, как описано в примере 4 международной патентной заявки WO 2008/047242, т.е. по следующему протоколу клонирования и секвенирования легких и тяжелых цепей антител против CD38.

(i) Получение РНК из гибридных клеток, продуцирующих антитело 38SB19, следующим образом: препараты тотальной РНК получали из 5×10^6 гибридных клеток, продуцирующих антитело 38SB19, с использованием набора RNeasy miniprep kit от Qiagen. В кратком изложении, 5×10^6 клеток осаждали и ресуспендировали в 350 мкл буфера RLT (содержащего 1% β-меркаптоэтанола). Суспензию гомогенизировали, пропуская ее через иглу калибром 21,5 и шприц приблизительно 10-20 раз или до тех пор, пока она не перестанет быть вязкой. Этанол (350 мкл 70% водного этанола) добавляли в гомогенат, который хорошо перемешивали. Раствор переносили на центрифужную колонку, помещали в пробирку для сбора емкостью 2 мл и центрифугировали при $>8000 \times g$ в течение 15 с. Колонку дважды промывали 500 мкл буфера RPE, затем переносили в новую пробирку, элюировали 30 мкл воды, не содержащей РНКазу, и центрифугировали в течение 1 мин. Элюат (30 мкл) помещали обратно в колонку для второго центрифугирования в течение 1 мин для элюирования. Аликвоту 30 мкл элюата разводили водой и использовали для измерения поглощения УФ при 260 нм для количественного анализа РНК.

(ii) кДНК получали с использованием реакции обратной транскрипции (RT) следующим образом: кДНК варибельной области антитела 38SB19 получали из тотальной РНК с использованием набора SuperscriptII kit от Invitrogen. Строго следовали протоколам набора, используя до 5 мкг тотальной РНК из полученного с помощью набора Qianeasy mini preps. В кратком изложении, РНК, 1 мкл случайных праймеров и 1 мкл смеси dNTP доводили до 12 мкл с помощью стерильной дистиллированной воды, не содержащей РНКазу, и инкубировали при 65°C в течение 5 мин. Затем смесь помещали на лед по меньшей мере на 1 мин. Затем 4 мкл 5-кратного реакционного буфера, 2 мкл 0,1M DTT и 1 мкл RNaseOUT добавляли и инкубировали смесь при 25°C в течение 2 мин в термоциклере MJ Research. Термоциклер оставляли таким образом, чтобы можно было добавить 1 мкл фермента SuperscriptII, а затем перезапустили на дополнительные 10 мин при 25°C перед переключением на 55°C на 50 мин. Реакцию термически инактивировали, нагревая до 70°C в течение 15 мин, и удаляли РНК, добавляя 1 мкл РНКазы H и инкубируя при 37°C в течение 20 мин.

(iii) Реакции ПЦР с вырожденными праймерами: способ для реакции ПЦР первого раунда с вырожденными праймерами в отношении кДНК, полученной из гибридных клеток, основан на способах, описываемых в Wang et al. (2000) и Co et al. (1992). Праймеры для этого раунда (табл. 1) содержат участки рестрикции t для облегчения клонирования в плазмиды pBluescriptII.

Таблица 1

Праймеры, используемые для реакций ПЦР с вырожденными праймерами

Праймер	Последовательность
BamIggG1 (SEQ ID NO: 56)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Abam (SEQ ID NO: 57)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO: 58)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO: 59)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
SacIMK (SEQ ID NO: 60)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO: 61)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC

Праймеры, используемые для реакций ПЦР с вырожденными праймерами, основаны на описанном в Wang et al., 2000, за исключением HindKL, основанной на Co et al., 1992. Смешанные основания определяют следующим образом: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V=A+C+G.

Компоненты реакции ПЦР (табл. 2) смешивали на льду в тонкостенных пробирках ПЦР, а затем переносили в термоциклер MJ Research, предварительно нагретый и поставленный на паузу при 94°C. Реакции осуществляли с использованием программы, полученной из Wang et al., 2000, следующим образом:

название: Wang45,
94°C 3:00 мин,
94°C 0:15 с,
45°C 1:00 мин,
72°C 2:00 мин,
повторить 229 раз,
72°C 6:00 мин,
хранение при 4°C,
конец.

Затем реакционные смеси для ПЦР подвергали электрофорезу в геле 1%-ной легкоплавкой агарозы, вырезали полосы, соответствующие от 300 до 400 п.н., очищали с использованием колонок Zymo DNA mini и отправляли в Agencourt biosciences для секвенирования. Соответствующие 5'- и 3'-праймеры для ПЦР использовали в качестве праймеров для секвенирования для получения кДНК варибельной области 38SB19 с обоих направлений.

(iv) Клонирование 5'-концевой последовательности осуществляли следующим образом: т.к. вырожденные праймеры, используемые для клонирования последовательностей кДНК варибельной области легкой цепи и тяжелой цепи 38SB19, изменяют 5'-концевые последовательности, для расшифровки полных последовательностей необходимы дополнительные попытки секвенирования. Предварительную последовательность кДНК, полученную описываемыми выше способами, использовали для поиска по сайту NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) на предмет последовательностей зародышевой линии мыши, из которых получают последовательность 38SB19. Конструировали ПЦР-праймеры (табл. 3) для отжига на лидерной последовательности антитела мыши таким образом, что с помощью новой реакции ПЦР можно получать полную кДНК варибельной области, не измененную ПЦР-праймерами. Реакции ПЦР, выделение полос и секвенирование осуществляли, как описано выше.

Таблица 2

Реакционные смеси для ПЦР легких и тяжелых цепей для клонирования последовательностей кДНК варибельной области 38SB19

Реакционная смесь для легкой цепи	Реакционная смесь для тяжелой цепи
5 мкл 10-кратного реакционного буфера для ПЦР (Roche)	5 мкл 10-кратного реакционного буфера для ПЦР (Roche)
4 мкл 10 мМ смеси dNTP (2,5 мМ каждого)	4 мкл 10 мМ смеси dNTP (2,5 мМ каждого)
2 мкл матрицы (реакция RT)	2 мкл матрицы (реакция RT)
5 мкл 10 мкМ левого праймера Sac1MK	2,5 мкл 10 мкМ левого праймера EcoMH1
5 мкл 10 мкМ правого праймера HindKL	2,5 мкл 10 мкМ левого праймера EcoMH2
5 мкл DMSO	5 мкл 10 мкМ правого праймера BamIgG1
0,5 мкл Taq-полимеразы (Roche)	5 мкл DMSO
23,5 мкл стерильной дистиллированной H ₂ O	0,5 мкл Taq-полимераза (Roche)
Всего 50 мкл	23,5 мкл стерильной дистиллированной H ₂ O Всего 50 мкл

(iv) Пептидный анализ для подтверждения последовательности осуществляли следующим образом: информацию о последовательности кДНК для варибельной области комбинировали с последовательно-

стью константной области зародышевой линии для получения полноразмерных последовательностей кДНК антитела. Затем вычисляли молекулярные массы тяжелой цепи и легкой цепи и сравнивали с молекулярными массами, полученными с помощью анализов LC/MS антитела 38SB19 мыши. В табл. 5 патента США № 8153765 приведена вычисленная масса последовательностей кДНК для LC и HC 38SB19 вместе со значениями, измеряемыми с помощью LC/MS. Измерения молекулярной массы соответствуют последовательностям кДНК легкой и тяжелой цепи 38SB19.

Таблица 3

5'-Концевые праймеры к лидерной последовательности мыши, используемые в реакциях ПЦР второго раунда для 38SB19

Праймер	Последовательность
Легкая цепь Лидерная последовательность LC 38SB19 (SEQ ID NO: 62)	ATGGAGTCACAGATTCAGGTC
Тяжелая цепь 38-1 HCLead1 (SEQ ID NO: 63)	TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC

В табл. 3 представлены 5'-концевые праймеры к лидерной последовательности мыши, используемые в реакциях ПЦР второго раунда для 38SB19. 3'-Концевые праймеры идентичны используемым в реакциях первого раунда, т.к. они являются праймерами к соответствующим последовательностям константной области.

Более конкретно, гуманизированные антитела 38SB19 можно получать, как описано в примере 5 международной патентной заявки WO 2008/047242, т.е. по следующему протоколу. Последовательности варибельной области hu38SB19 подвергали оптимизации кодонов и синтезировали Blue Heron Biotechnology. Последовательности фланкировали участками распознавания рестрикционных ферментов для клонирования в рамке считывания с соответствующими последовательностями константной области в одноцепочечные и тандемные двухцепочечные плазмиды для экспрессии у млекопитающих. Варибельную область легкой цепи клонируют в участки EcoRI и BsiWI в плаزمиде ps38SB19LCzv1.0 и ps38SB19v1.00 (фиг. 2A и 2C в WO 2008/047242). Варибельную область тяжелой цепи клонируют в участки HindIII и ApaI в плазмиде ps38SB19HCNv1.0 и ps38SB19v1.00 (фиг. 2B и 2C в WO 2008/047242). Эти плазмиды можно использовать для экспрессии hu38SB19 при транзитной или стабильной трансфекции в клетки млекопитающих. Для получения других химерных и гуманизированных антител использовали аналогичные конструкции экспрессирующего вектора. Транзитные трансфекции для экспрессии hu38SB19 в клетках HEK-293T осуществляли с использованием реагентов CaPO₄ от BD Biosciences. Прилагаемые протоколы немного модифицировали для повышения выхода экспрессии. В кратком изложении, 2×10⁶ клеток HEK-293T помещали в планшет для культивирования тканей диаметром 10 см, покрытые полиэтиленгликолем (PEG) за 24 ч до трансфекции. Начинали трансфекцию, промывая клетки PBS и заменяя среды 10 мл DMEM (Invitrogen) с 1% Ultra Low IgG FBS (HyClone). Раствор А (10 мкг ДНК, 86,8 мкл раствора Ca²⁺ и до 500 мкл H₂O) по каплям добавляли в раствор В, перемешивая на центрифуге типа вортекс. Смесь инкубировали при RT в течение 1 мин и 1 мл смеси по каплям добавляли в каждый планшет диаметром 10 см. Приблизительно через 16 ч после трансфекции среды заменяли 10 мл свежей DMEM с 1% Ultra Low IgG FBS. Приблизительно через 24 ч добавляли 2 мМ бутират натрия в каждый планшет диаметром 10 см. Через 4 дня собирали результаты трансфекции. Супернатант подготавливали для аффинной хроматографии с протеином А посредством добавления 1/10 объема 1М буфера Tris/HCl, pH 8,0. Супернатант с доведенным pH фильтровали через мембрану фильтра толщиной 0,22 мкм и нагружали на колонку с сефарозой и протеином А (HiTrap Protein A HP, 1 мл, Amersham Biosciences), уравновешенную буферным раствором (PBS, pH 7,3). Предколонку с Q-сефарозой (10 мл) присоединяли выше колонки с протеином А при нагрузке образцом для снижения контаминации клеточным материалом, таким как ДНК. После нагрузки образцом предколонку удаляли и переворачивали колонку с протеином А для промывания и элюирования. Колонку промывали буферным раствором до получения стабильного исходного уровня без поглощения при 280 нм. Антитело элюировали 0,1М буфером уксусной кислоты, содержащим 0,15М NaCl, pH 2,8, с использованием скорости потока 0,5 мл/мин. Фракции приблизительно 0,25 мл собирали и нейтрализовали добавлением 1/10 объема 1М Tris/HCl, pH 8,0. Пиковые фракции подвергали диализу дважды в течение ночи против PBS и очищенное антитело подсчитывали по поглощению при OD₂₈₀. Гуманизированные и химерные антитела также можно очищать с использованием колонки с протеином G с использованием немного иных способов.

Все приведенные в качестве примеров химерные, гуманизированные антитела и/или антитела с измененной поверхностью против CD38 экспрессировали и очищали с использованием способов, аналогичных описываемым выше.

Для антител по изобретению авторы настоящего изобретения определяли подходящую дозу и схему лечения для получения хорошо переносимого противоопухолевого лечения, позволяющего лечить инди-

видуумов, страдающих CD38⁺-гемобластомом, в частности, CD38⁺-множественной миеломой, более конкретно рецидивирующей и/или рефрактерной CD38⁺-множественной миеломой.

Таким образом, использовали ускоренный режим повышения дозы для первых пяти уровней доз в диапазоне от 0,0001 до 0,1 мг/кг, вводимых каждые две недели, с одним оцениваемым индивидуумом на уровень дозы. Все последующие уровни доз, такие как 0,3, 1, 3, 5, 10 и 20 мг/кг, вводили каждые 2 недели, 10 мг/кг также вводили каждую неделю с последующим классическим дизайном 3+3 для повышения доз с учетом токсичности уровня доз, среднее количество циклов находилось в диапазоне от 2,0 до 50,0 на введение.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения показали, что используемое антитело обладает профилем безопасности, корректируемым с максимальной переносимой дозой, составляющей более 10 мг/кг.

Исследования иммуногенности, осуществленные авторами настоящего изобретения, показали, что человек не продуцирует антитела против антитела против CD38.

Кроме того, авторы настоящего изобретения смогли показать, что антитело по изобретению имеет высокую эффективность связывания у людей, о чем свидетельствует высокая занятость рецепторов при низких дозах. Занятость рецепторов определяли, например, на уровне дозы 1 мг/кг, и она достигала диапазона от 84,1 до 97,7% при 10 мг/кг каждые две недели.

Как правило, занятость рецепторов оценивают с использованием двух моноклональных антител (mAb), связывающихся с двумя разными эпитопами антигена CD38. Mab1 является специфичным для того же эпитопа, что и, например, hu38SB19, и, таким образом, является репортером для свободных участков CD38 (не занятых, например, hu38SB19). Второе моноклональное антитело, Mab2, направленное против иного эпитопа, чем hu38SB19, представляет собой положительный контроль на наличие CD38⁺-клеток и для оценки количества антигена CD38, оставшегося на поверхности клетки после добавки лекарственного средства *in vitro*. Использование бус в качестве калибраторов и не прямое определение делают возможным количественный подход без какой-либо модификации связывающей способности hu38SB19. При комбинировании результатов получают плотность рецепторов и занятость рецепторов на клетку.

Не наблюдали значимого повышения C_{max} в цикле 2 по сравнению с C_{max} в цикле 1 для диапазона доз от 0,03 до 3 мг/кг.

Авторы настоящего изобретения дополнительно показали, что антитело достигало ингибирования роста опухоли с пороговым значением при C_{max} для 1 пациента на уровне доз 5 мг/кг и 5 пациентов на уровне доз 10 мг/кг.

Авторы настоящего изобретения, в частности, показали, что индивидуум, страдающий CD38⁺-гемобластомом, в частности CD38⁺-множественной миеломой, в особенности рецидивирующей и/или рефрактерной CD38⁺-множественной миеломой, демонстрировал индивидуальный ответ при введении антитела против CD38 по изобретению в дозе 1, 5 и 10 мг/кг.

Авторы настоящего изобретения, в частности, наблюдали, что достигали порогового значения ингибирования роста опухоли при C_{max} для 1 пациента на уровне доз 5 мг/кг и для 5 пациентов на уровне доз 10 мг/кг.

Антитело по изобретению предназначено для применения в качестве лекарственного средства, где указанное антитело вводят человеку в безопасной терапевтической дозе 20 мг/кг или менее.

В одном из вариантов осуществления антитело предназначено для применения в лечении CD38⁺-гемобластома, в частности для лечения множественной миеломы, в особенности для лечения рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломы.

Как применяют в настоящем описании, CD38⁺-гемобластомы, подлежащие лечению, определены в разделе "CD38⁺-гемобластомы".

Человек определен выше в разделе "индивидуум".

Как применяют в настоящем описании, термин "лечение" означает реверсирование, облегчение, ингибирование прогрессирования или профилактику нарушения или состояния, по отношению к которому используют термин, или одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояния.

Как применяют в настоящем описании, термин "лечение CD38⁺-гемобластома" означает ингибирование роста злокачественных CD38⁺-клеток опухоли и/или прогрессирования метастазирования из указанной CD38⁺-опухоли. Такое лечение также может приводить к регрессированию роста опухоли, т.е. снижению размера измеримой опухоли. В частности, такое лечение приводит к полному регрессированию CD38⁺-опухоли или CD38⁺-метастазов.

В контексте настоящего изобретения термин "терапевтически эффективное количество" антитела означает достаточное количество антитела для лечения указанного CD38⁺-гемобластома, как обнаружено авторами настоящего изобретения и представлено в настоящем описании.

В конкретном варианте осуществления указанное терапевтически эффективное количество антитела, вводимого индивидууму, является дозой в диапазоне от 0,0001 до 20 мг/кг, в частности дозой в диапазоне от 1 до 20 мг/кг, более конкретно 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению можно вводить раз в неделю или раз в две недели.

В другом варианте осуществления указанное терапевтически эффективное количество антитела, вводимого индивидууму, является дозой в диапазоне от 1 до 20 мг/кг, от 3 до 20 мг/кг, от 5 до 20 мг/кг или от 10 до 20 мг/кг, например, раз в неделю или раз в две недели. Фактически, показано, что эти дозы являются безопасными, в то же время в случае некоторых индивидуумов показана эффективность.

В другом варианте осуществления указанное терапевтически эффективное количество антитела, вводимого индивидууму, является дозой 10 мг/кг раз в неделю или 20 мг/кг, например, раз в неделю или раз в две недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению можно вводить по периодической программе с интервалом между каждым введением 1 неделя или 2 недели, которую можно пролонгировать на 1-2 недели в зависимости от переносимости предшествующего введения. Однако авторы настоящего изобретения, главным образом, наблюдали побочные эффекты, не являющиеся тяжелыми.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления введение антитела повторяют в виде нового цикла непосредственно после предшествующего цикла.

Как применяют в настоящем описании, термин "цикл" относится в случае введения "раз в неделю" к одной неделе, в случае введения "раз в две недели" один цикл относится к двум неделям.

В одном из вариантов осуществления количество циклов введения может составлять от 2 до 50, в частности, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 45, 50 циклов.

Таким образом, количество циклов введения антитела по изобретению можно выбирать из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 45, 50 циклов.

Антитело по изобретению вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления можно повышать дозу в течение лечения после оценки ответа заболевания.

В контексте настоящего изобретения минимальная доза соответствует 0,0001 мг/кг, где уровень доз 0,0001 мг/кг представляет собой 10% от теоретической занятости рецепторов CD38 на нормальных В- и Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение осуществляют с конкретной скоростью инфузии.

В частности, антитело будут вводить с исходной скоростью инфузии от 0,042 до 250 мг/ч, в частности, исходная скорость инфузии составляет 0,042 мг/ч.

В некоторых вариантах осуществления исходная скорость инфузии зависит от дозы, подлежащей введению.

Таким образом, в одном примере антитело по изобретению, как правило, вводят, например, в случае дозы 0,0001 мг/кг с исходной скоростью 0,042 мг/ч всего для 3 мл, например, в случае дозы 0,001 мг/кг с исходной скоростью 0,42 мг/ч всего для 3 мл, например, в случае дозы 0,01 мг/кг с исходной скоростью 1,4 мг/ч, например, в случае дозы 0,03 мг/кг с исходной скоростью 4,2 мг/ч, например, в случае дозы 0,1 мг/кг с исходной скоростью 7 мг/ч, например, в случае дозы 0,01 мг/кг с исходной скоростью 1,4 мг/ч, например, в случае дозы 0,3 мг/кг с исходной скоростью 10,5 мг/ч, например, в случае дозы 1 мг/кг с исходной скоростью 17,5 мг/ч, например, в случае дозы 3 мг/кг с исходной скоростью 52,5 мг/ч, например, в случае дозы 5 мг/кг с исходной скоростью 87,5 мг/ч, например, в случае дозы 10 мг/кг с исходной скоростью 175 мг/ч и, например, в случае дозы 20 мг/кг с исходной скоростью 250 мг/ч.

В течение введения, как правило, за индивидуумом наблюдают на предмет признаков реакций гиперчувствительности и продолжают введение исключительно в отсутствие реакций гиперчувствительности.

Однако следует понимать, что точное время введения (раз в неделю или раз каждые две недели), количество циклов и исходная скорость инфузии будут находиться в диапазоне значений, представленных в настоящем описании, но однако точные значения будет определять лечащий врач для конкретного индивидуума в зависимости от факторов, включающих подвергаемый лечению CD38⁺-гемобластоз и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого антитела; конкретной используемой композиции, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания индивидуума.

Следует понимать, что лечащий врач может модифицировать и адаптировать схему введения с учетом ответа заболевания.

"Ответ заболевания" можно определять по стандартным критериям для гемобластозов и стадирования.

Способы оценки ответа заболевания в случае гемобластоза, в частности CD38⁺-гемобластоза, известны специалисту в этой области.

Как правило, способы оценки ответа заболевания можно выбирать из группы, состоящей из оценки общего состояния по Карновскому, количественного анализа специфических маркеров, биопсию и/или пункцию костного мозга, рентгенологическую визуализацию плазмоцитомы, исследование костей скелета, количественный анализ М-белка (в сыворотке и/или моче в течение 24 ч) и уровней свободных легких цепей в сыворотке или уровней легких цепей в моче, β 2-микроглобулин сыворотки, биопсию лимфоуз-

лов и/или рентгенологическую оценку опухоли (с помощью рентгеновского исследования, компьютерной томографии [КТ], PET или магнитно-резонансной томографии [МРТ]), анализ крови, включая подсчет бластов.

Лучшие способы оценки ответа заболевания при гемобластозе зависят от типа CD38⁺-гемобластоза и известны специалисту в этой области.

Учитывая результаты, полученные при оценке ответа заболевания, затем можно стратифицировать ответ заболевания согласно стандартным критериям для указанного заболевания и классифицировать его по полному ответу или полной ремиссии (CR), частичному ответу (PR), стабильному заболеванию (SD) или прогрессирующему заболеванию (PD).

"Оценка по Карновскому" относится к баллам от 100 до 0, где 100 означает "идеальное" здоровье, а 0 означает смерть.

Термин "маркеры", используемый в отношении оценки ответа, как правило, может включать маркеры в сыворотке и/или плазме, в качестве неограничивающих примеров, такие как Hs-CRP, фактор некроза опухоли (ФНО), ИЛ-6, ИЛ-1 β , ИФН λ , и плотность и занятость рецепторов CD38.

В одном примере способами оценки ответа заболевания у индивидуума, страдающего множественной миеломой, являются биопсия и/или пункция костного мозга, рентгенологическая визуализация плазмотомы, исследование костей скелета, количественный анализ М-белка, как описано выше, и измерение β 2-микроглобулина в сыворотке.

Оценка ответа заболевания дополнительно может включать плотность рецепторов и занятость рецепторов на опухолевых клетках в кровотоке (в периферической крови), плотность рецепторов и занятость рецепторов на бластах и плазматических клетках в костном мозге и уровень антител человека против лекарственного средства (ADA).

Антитело по изобретению можно вводить в форме фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый эксципиент и, необязательно, матрицы с замедленным высвобождением, такие как биodeградируемые полимеры, для получения терапевтических композиций.

Термин "фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным веществам и композициям, не вызывающим побочную, аллергическую или другую нежелательную реакцию при введении млекопитающему, в особенности человеку, при необходимости. Фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, дилуенту, инкапсулирующему материалу или вспомогательному средству любого типа.

Форма фармацевтических композиций, включающих антитело по изобретению, разумеется, зависит от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, массы и пола индивидуума и т.д.

Антитело по изобретению составляют для внутривенного введения.

В частности, фармацевтические композиции, включающие антитело по изобретению, могут содержать наполнители, являющиеся фармацевтически приемлемыми для состава, способного быть инъецируемым. В частности, они могут являться изотоническими, стерильными, физиологическими растворами (дигидрофосфата или дифосфата натрия, хлорида натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей), или сухими, в частности, лиофилизированными, композициями, которые после добавления в зависимости от случая стерилизованной воды или физиологического раствора делают возможным составление инъецируемых растворов.

Для получения фармацевтических композиций можно растворять или диспергировать эффективное количество антитела по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до той степени, чтобы была возможность введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и необходимо предохранять ее от контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы.

Носитель может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Можно поддерживать подходящую текучесть, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных веществ, стабилизаторов, крипротекторов или антиоксидантов. Предотвращение действия микроорганизмов можно осуществлять с помощью антибактериальных и противогрибковых средств. Во многих случаях предпочтительным будет включение изотонических средств, например сахаров или хлорида натрия.

Стерильные инъецируемые растворы получают посредством включения активных соединений в необходимом количестве в подходящем растворителе с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией посредством фильтрации. Как правило, дисперсии получают посредством включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильном наполнителе, содержащем основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты

из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъеклируемых растворов предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и лиофилизации, с помощью которых получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его раствора, предварительно стерилизованного посредством фильтрации.

После составления растворы будут вводить способом, совместимым с составлением лекарственного средства и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводить во множестве лекарственных форм, таких как тип инъеклируемых растворов, описываемых выше, но также можно использовать капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

В случае внутривенного введения в водном растворе, например, раствор необходимо соответствующим образом забуферивать, и жидкий дилуэнт сначала делают изотоническими с использованием достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного введения. В связи с этим, стерильные водные среды, которые можно использовать, будут известны специалистам в этой области в свете настоящего описания. Например, одну дозу можно растворять в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлять к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза или инъектировать внутривенно в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 и 1570-1580). Безусловно, будут осуществлять некоторые изменения дозировки в зависимости от состояния индивидуума, подвергаемого лечению. В любом случае, лицо, ответственное за введение, будет определять подходящую дозу для индивидуума.

В одном примере антитело составляют для внутривенного введения, таким образом, антитело присутствует в виде концентрата раствора для инфузии в сосудах, например, содержащих 5 мг/мл (100 мг/20 мл) антитела по изобретению.

Для введения индивидуумам подходящий объем состава антитела, как правило, разводят в инфузионном мешке, например, 0,9% раствора хлорида натрия. Конечный объем инфузии, соответствующий дозе антитела по изобретению, вводят в течение периода времени, зависящего от дозы, подлежащей введению, и, таким образом, от вводимого количества белка в час.

В конкретном варианте осуществления антитело против CD38 для применения по изобретению вводят в виде выделенного антитела. Выделенное антитело против CD38 можно вводить в отдельности, или совместно с дексаметазоном, или в комбинации с химиотерапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из леналидомида, карфилзомиба, бортезомиба, мелфалана, винкристина, цитарабина и циклофосамида, необязательно, вместе с дексаметазоном. В случае введения не в отдельности антитело против CD38 и другие лекарственные средства можно вводить одновременно или раздельно (например, последовательно в течение периода времени).

Антитело по изобретению можно вводить в комбинации с лекарственным средством для профилактики или контроля утомляемости, тошноты, гипертермии, кашля, рвоты, гиперкальциемии, головной боли, запора, боли в костях, озноба, диареи, пневмонии, анемии, дисгевзии, гипокалиемии, лихорадки и гипергликемии.

В другом варианте осуществления лекарственное средство для профилактики или контроля утомляемости, тошноты, гипертермии, кашля, рвоты, гиперкальциемии, головной боли, запора, боли в костях, озноба, диареи, пневмонии, анемии, дисгевзии, гипокалиемии, лихорадки и гипергликемии можно вводить перед лечением антителом.

Как применяют в настоящем описании, лечащий врач может оценивать ответ заболевания и, таким образом, адаптировать режим введения.

На всем протяжении настоящей заявки термин "содержащий" следует интерпретировать как включающий все конкретные упомянутые признаки, а также необязательные, дополнительные, неуказанные. Как применяют в настоящем описании, используя термин "содержащий", также описывают вариант осуществления, где отсутствуют иные признаки, чем указанные конкретно (т.е. "состоящий из").

Без ограничения настоящего изобретения ниже в иллюстративных целях дополнительно приведен ряд вариантов осуществления настоящего изобретения.

Пункт 1. В одном из вариантов осуществления описывают способ лечения пациента, имеющего рецидивирующую и/или рефрактерную множественную миелому, включающий введение пациенту антитела, специфически связывающегося с CD38, где указанное антитело вводят пациенту в безопасной терапевтической дозе 20 мг/кг или менее.

Пункт 2. В другом варианте осуществления описывают фармацевтическую композицию, содержащую антитело, специфически связывающееся с CD38, для применения в качестве лекарственного средства в лечении рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломы, где указанное антитело подлежит введению человеку в безопасной терапевтической дозе приблизительно 20 мг/кг или менее.

Пункт 3. В другом варианте осуществления описывают способ или фармацевтическую композицию по п.1 или 2, где антитело способно уничтожать CD38⁺-клетку у человека посредством индукции апоптоза, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Пункт 4. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую ком-

позицию по любому из пп.1-3, где пациент имеет по меньшей мере одно условие, выбранное из группы, состоящей из (а) измеряемого уровня М-белка в сыворотке более приблизительно 0,5 г/дл, (b) уровня М-белка в моче более приблизительно 200 мг (моча в течение 24 ч), (с) повышенного уровня свободных легких цепей (FLC) в сыворотке более приблизительно 10 мг/дл с аномальным соотношением FLC, и их комбинацию.

Пункт 5. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-4, где указанное антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области (CDR), имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13, 37 и 15, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области (CDR), имеющие аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18.

Пункт 6. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-5, где указанное антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52.

Пункт 7. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-6, где безопасная терапевтическая доза составляет приблизительно от 1 до приблизительно 20 мг/кг.

Пункт 8. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-6, где безопасная терапевтическая доза составляет приблизительно 5 мг/кг, или приблизительно 10 мг/кг, или приблизительно 20 мг/кг.

Пункт 9. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-8, где безопасную терапевтическую дозу указанного антитела вводят внутривенно.

Пункт 10. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-9, где безопасную терапевтическую дозу указанного антитела вводят раз в неделю или раз каждые две недели.

Пункт 11. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где безопасная терапевтическая доза составляет приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг, вводимых раз каждые две недели.

Пункт 12. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где безопасная терапевтическая доза составляет приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг, вводимых один раз каждую неделю.

Пункт 13. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-12, где безопасную терапевтическую дозу указанного антитела вводят с исходной скоростью инфузии в диапазоне от приблизительно 0,042 до приблизительно 250 мг/ч.

Пункт 14. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-13, где антитело вводят в комбинации с дексаметазоном.

Пункт 15. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-14, где указанное антитело не вызывает продукцию аутоантител против указанного антитела при введении человеку в дозе приблизительно 20 мг/кг или менее.

Пункт 16. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно проявлять детектируемую занятость рецепторов CD38 у человека при введении указанному человеку на уровне дозы приблизительно 1 мг/кг каждые две недели.

Пункт 17. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно проявлять по меньшей мере приблизительно 84,1% занятости рецепторов CD38 у человека при введении указанному человеку на уровне дозы приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг каждые две недели.

Пункт 18. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно проявлять по меньшей мере приблизительно 97,7% занятости рецепторов CD38 у человека при введении указанному человеку на уровне дозы приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг каждые две недели.

Пункт 19. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении указанному человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг каждые две недели.

Пункт 20. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении указанному человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно

20 мг/кг каждую неделю.

Пункт 21. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении указанному человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг каждые две недели.

Пункт 22. В другом варианте осуществления также описывают способ или фармацевтическую композицию по любому из пп.1-10, где указанное антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении указанному человеку на уровне дозы в диапазоне от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг каждую неделю.

Пункт 23. В другом варианте осуществления также описывают стандартную лекарственную форму, содержащую фармацевтическую композицию по любому из пп.1-22.

Пункт 24. В другом варианте осуществления также описывают промышленное изделие, содержащее фармацевтическую композицию по любому из пп.1-22 и контейнер.

Краткое описание последовательностей

В SEQ ID NO: 1-3 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB13.

В SEQ ID NO: 4-6 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB13.

В SEQ ID NO: 7-9 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB18.

В SEQ ID NO: 10-12 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB18.

В SEQ ID NO: 13-15 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB19.

В SEQ ID NO: 16-18 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB19.

В SEQ ID NO: 19-21 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB30.

В SEQ ID NO: 22-24 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB30.

В SEQ ID NO: 25-27 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB31.

В SEQ ID NO: 28-30 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB31.

В SEQ ID NO: 31-33 представлена последовательность CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитела 38SB39.

В SEQ ID NO: 34-36 представлена последовательность CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитела 38SB39.

В SEQ ID NO: 37 представлена последовательность CDR2-H гуманизованного антитела 38SB19.

В SEQ ID NO: 38-43 представлены последовательности VL антител.

В SEQ ID NO: 44-49 представлены последовательности VH антител.

В SEQ ID NO: 50-51 представлены последовательности VH гуманизованных антител.

В SEQ ID NO: 52-55 представлены последовательности VL гуманизованных антител.

В SEQ ID NO: 56-61 представлены последовательности праймеров, используемых для реакции ПЦР с вырожденными праймерами первого раунда для клонирования и секвенирования легких и тяжелых цепей антител против CD38.

В SEQ ID NO: 62-63 представлены праймеры для 5'-концевой лидерной последовательности мыши, используемые для реакций ПЦР 38SB19 второго раунда для клонирования и секвенирования легких и тяжелых цепей антител против CD38.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано с помощью следующих примеров.

Пример 1.

Авторы настоящего изобретения определяли подходящую дозу для введения антитела hu38SB19 и схему лечения для получения хорошо переносимого противоопухолевого лечения, позволяющего лечить пациентов, страдающих CD38⁺-гемобластозом, в частности множественной миеломой, более конкретно рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой.

Таким образом, в следующем примере описывают результаты клинических испытаний фазы 1, демонстрирующие безопасную терапевтическую дозу этого конкретного антитела против CD38 hu38SB19 для эффективного лечения CD38⁺-гемобластома, такого как множественная миелома, у людей.

Пациенты.

Всего в исследовании лечению подвергали 32 пациента. 40,6% выборки составляли женщины; средний возраст составлял 64,8 (±8,8). Оценка общего состояния по Карновскому составляла более 60% у всех пациентов.

32 пациента включали 3 пациентов с В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL), 2 с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и 27 с множественной миеломой (MM).

80,0% пациентов с множественной миеломой составляли женщины со средним возрастом 63,6 (±8,0). Пациентам с множественной миеломой в качестве предшествующей противоопухолевой терапии вводили бортезомиб в 100%, леналидомид в 92,6% и проводили трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT) в 81,5% случаев.

Способы.

Выделенное гуманизированное моноклональное антитело (mAb) IgG1 hu38SB19 вводили в качестве единственного средства посредством IV инфузии каждую неделю (QW) или каждые 2 недели (Q2W) взрослым пациентам с выбранными CD38⁺-гемобластозами, прогрессировавшими во время или после стандартной терапии, или для которых не существует эффективной стандартной терапии.

Для первых 5 уровней доз (DL) использовали ускоренный режим повышения доз (от 0,0001 до 0,1 мг/кг каждые 2 недели) с одним оцениваемым пациентом на уровень доз, если не возникала дозолIMITирующая токсичность (DLT). Все последующие уровни дозы (0,3, 1, 3, 5, 10, 20 мг/кг каждые 2 недели и 10 мг/кг каждую неделю) следовали классическому дизайну 3+3 повышения доз с учетом дозолIMITирующей токсичности.

32 пациента поддавались оценке на конечную точку дозолIMITирующей токсичности и 32 - на ответ опухоли.

Медиана количества циклов находилась в диапазоне от 2,0 до 50,0.

Результаты.

32 пациентов подвергали лечению на всех уровнях доз, включая 3 пациентов с В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL), 2 с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и 27 с множественной миеломой (MM).

Исследования, касающиеся уровней доз 20 мг/кг каждые 2 недели и 10 мг/кг раз в неделю, оценивают в настоящее время, и максимальная переносимая доза еще не достигнута.

ДозолIMITирующие токсичности ограничены инфузионными реакциями степени 2 в течение цикла 1 с 1 при DL 0,3 мг/кг и 1 при DL 3,0 мг/кг. Их снижали посредством включения общепринятой премедикации метилпреднизолоном, дифенгидраминам, ранитидином и ацетаминофеном.

Наиболее часто возникающими побочными реакциями ($\geq 10\%$) на всех уровнях доз, независимо от причины, являются утомляемость (46,9%), рвота (31,3%), гипертермия (28,1%), кашель (25%), рвота (21,9%), гиперкальциемия (18,8%), при этом каждая из головной боли, запоров, боли в костях, озноба и диареи возникала у 15,6% пациентов. Кроме того, каждая из пневмонии, анемии, дивгезии и гипокалиемии возникала у 12,5% пациентов.

Серьезные побочные реакции, связанные с терапией, включают пневмонию степени 3 (6,3%), связанную с лихорадкой (3,1%), гипергликемией (3,1%) и одной инфузионной реакцией степени 2 (3,1%).

Из 19 пациентов, подвергнутых лечению при уровне доз от 1,0 до 10 мг/кг каждые 2 недели, 1 имел хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), 1 имел неходжкинскую лимфому (NHL) и 17 имели множественную миелому (MM).

17 пациентов с множественной миеломой были старше, и их подвергали более сильной премедикации; с медианой возраста 64 лет (диапазон: 55-74); и медианой из семи предшествующих схем лечения (диапазон: 2-14). Всем пациентам с MM ранее вводили леналидомид и бортезомиб. Медиана времени от постановки диагноза до введения первой дозы hu38SB19 составляла 6,8 лет (диапазон 1,8-16,8 лет).

Ответы в этой группе (см. чертеж) согласно критериям множественной миеломы European Group for Bone Marrow and Transplant (EBMT) включали 1 частичный ответ (PR) при 1 мг/кг (n=3) и 5 мг/кг (n=3) и 1 минимальный ответ (MR) при уровне доз 3 мг/кг (n=6). При уровне доз 10 мг/кг наблюдали 3 частичных ответа (PR) и 2 стабильных заболевания (SD) среди 6 пациентов с множественной миеломой, подвергнутых лечению.

В случае 19 пациентов, подвергнутых лечению при DL 1 мг/кг или выше, медиана времени лечения составляла 8 недель (диапазон 2-50 недель).

При исследованиях иммуногенности не обнаруживали антитела против hu38SB19.

Занятость рецепторов можно определять, начиная с уровня дозы 1 мг/кг, и она достигала диапазона от 84,1 до 97,7% при 10 мг/кг.

При фармакокинетическом анализе (PK) наблюдали не просто пропорциональное дозе повышение экспонирования в диапазоне доз от 0,03 до 10 мг/кг с выведением в схожем диапазоне от 5 до 10 мг/кг.

Не наблюдали накопления с учетом C_{max} в цикле 2 в диапазоне доз от 0,03 до 3 мг/кг.

Порогового значения ингибирования роста опухоли достигали при C_{max} для 1 пациента при DL 5 мг/кг и у 5 пациентов при DL 10 мг/кг.

Антитело против CD38 hu38SB19 демонстрирует обнадеживающую активность в качестве единственного средства у подвергнутых сильной премедикации пациентов с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой.

Содержание всех процитированных ссылок (включая литературные ссылки, патенты, патентные заявки и веб-сайты), которые могут быть процитированы на всем протяжении настоящей заявки или указаны ниже, таким образом, специально включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для всех целей. Если не указано иначе, в изобретении можно использовать общепринятые способы иммунологии, молекулярной биологии и клеточной биологии, хорошо известные в этой области.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломы у человека, включающий введение человеку антитела, которое специфически связывается с CD38, в безопасной терапевтической дозе 10 мг/кг или 20 мг/кг однократно каждые две недели,

где антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь,

где тяжелая цепь содержит три последовательно расположенные определяющие комплементарность области (CDR) с SEQ ID NO: 13, 37 и 15,

где легкая цепь содержит три последовательно расположенные определяющие комплементарность области (CDR) с SEQ ID NO: 16, 17 и 18.

2. Способ по п.1, где антитело способно уничтожать CD38⁺-клетку у человека посредством индукции апоптоза, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

3. Способ по п.1, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

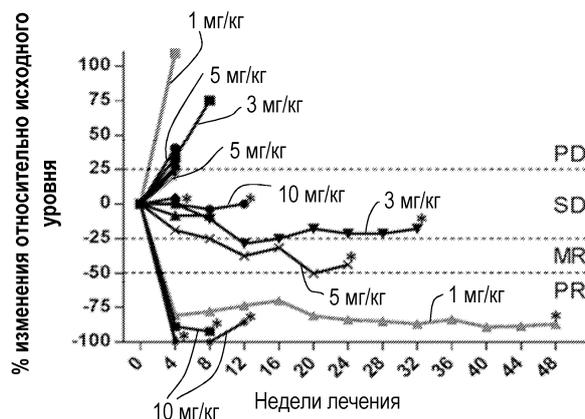
4. Способ по любому из пп.1-3, где человек имеет измеряемый уровень М-белка в сыворотке более 0,5 г/дл, уровень М-белка в моче более 200 мг (24-часовая моча) и/или повышенный уровень свободных легких цепей в сыворотке (FLC) больше 10 мг/дл с аномальным соотношением FLC κ/λ.

5. Способ по любому из пп.1-4, где безопасную терапевтическую дозу указанного антитела вводят внутривенной инфузией.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело вводят в комбинации с дексаметазоном.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанное антитело не вызывает продукцию аутоантител против указанного антитела при введении человеку.

8. Способ по любому из пп.1-7, где указанное антитело способно ингибировать рост опухоли у человека при введении указанному человеку при уровне дозы 10 мг/кг или 20 мг/кг однократно каждые две недели.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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