

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035979**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.08**

**(21)** Номер заявки  
**201790548**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.09.08**

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

---

**(54) ВАРИАНТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ АНТИ-CD38 АНТИТЕЛАМИ**

---

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

**(32)** 2014.09.09; 2014.12.04

**(33)** US

**(43)** 2017.09.29

**(86)** PCT/US2015/048899

**(87)** WO 2016/040294 2016.03.17

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

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

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

**(56)** US-B1-7223397

DE WEERS M. et al. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. The Journal of Immunology. 27 December 2010, Vol. 186, pages 1840-1848; page. DOI: 10.4049/jimmunol.1003032.

WO-A1-2006099875

WO-A1-2014048921

DECKERT J. et al. SAR650984, A Novel Humanized CD38-Targeting Antibody, Demonstrates Potent Antitumor Activity in Models of Multiple Myeloma and Other CD38p Hematologic Malignancies. Clinical Cancer Research, 01 September 2014, Vol. 20, No. 17, pages 4574-4583; abstract; figure 4, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0695.

US-A1-20090076249

WO-A2-2005063819

WO-A2-2003106498

PROSNIAK M. et al. Development of a Cocktail of Recombinant-Expressed Human Rabies Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies for Postexposure Prophylaxis of Rabies. The Journal of Infectious Diseases, 2003, Vol. 187, pages 53-56; page 54, first column - second column, first paragraph

NIJHOF I.S. et al. Modulation of CD38 Expression Levels on Multiple Myeloma Tumor Cells By All-Trans Retinoic Acid Improves the Efficacy of the Anti-CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab, Blood, 06 December 2014, Vol. 124, No. 21, page 2096; abstract.

---

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

---

**B1**

**035979**

**035979 B1**

### Область применения изобретения

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

### Предпосылки создания изобретения

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

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

CD38 представляет собой мембранный белок типа II, функцией которого является опосредованная рецепторами адгезия и сигнализация, а также опосредование мобилизации кальция посредством эктоферментативной активности, катализ образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из  $NAD^+$ , а также гидролиз цАДФР в АДФ-рибозу (АДФР). CD38 опосредует секрецию цитокинов, а также активацию и пролиферацию лимфоцитов (Funaro et al., J. Immunol., 145:2390-6, 1990; Terhorst et al., Cell 77:1-80, 1981; Guse et al., Nature 398:70-3, 1999) и благодаря своей НАД-гликогидролазной активности регулирует уровни внеклеточного  $NAD^+$ , который задействован в модуляции компартмента регуляторных Т-клеток (Adriouch et al., 14:1284-92, 2012; Chiarugi et al., Nature Reviews 12:741-52, 2012).

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

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

### Изложение сущности изобретения

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

### Краткое описание графических материалов

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

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

фиг. 2 иллюстрирует, что ПТРК повышает экспрессию CD38 на моноклеарных клетках костного

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

фиг. 3А - даратумумаб-индуцированную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) (верхняя панель) и антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) (нижняя панель) в клеточной линии ММ ХG1, предварительно обработанной с или без 10 нМ ПТРК в течение 48 ч перед реализацией КЗЦ или АЗКЦ в присутствии 10 мкг/мл даратумумаба. По оси Y показан процент (%) КЗЦ или АЗКЦ. Данные показывают среднее и СОС по меньшей мере по трем экспериментам, р-значения между указанными группами рассчитывали, используя парный t-критерий Стьюдента. Дара: даратумумаб; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;

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

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

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

фиг. 4В иллюстрирует, что предварительная обработка первичных клеток ММ в течение 48 ч 10 нМ ПТРК усиливает даратумумаб-индуцированную АЗКЦ первичных клеток ММ. Клетки ММ предварительно обрабатывали в течение 48 ч с или без 10 нМ ПТРК, как указано на фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 0-10 мкг/мл. На графике представлены объединенные результаты по образцам 13 пациентов. \*  $p < 0,05$ . ДАРА: даратумумаб;

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

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

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

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

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

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

фиг. 5G - результаты *in vitro* КЗЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 13 и пациента 14, предварительно обработанных в течение 48 ч с или без 10 нМ ПТРК, как указано на фигуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл;

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

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

фиг. 6В - результаты *in vitro* АЗКЦ для первичных клеток ММ, выделенных из организма пациента 7 и пациента 8, предварительно обработанных в течение 48 ч с или без 10 нМ ПТРК, как указано на фи-

гуре, при концентрации даратумумаба в диапазоне 1-10 мкг/мл;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

фиг. 9С - влияние ПТРК на экспрессию CD46 на первичных клетках ММ после 48 ч инкубации клеток с (серые столбики) или без (черные столбики) 10 нМ ПТРК, как указано, не: не существенно;

фиг. 10А - экспрессию CD55 на первичных клетках ММ, выделенных из организма 16 пациентов с ММ, после 48 ч инкубации клеток с (черные столбики) или без (белые столбики) 10 нМ ПТРК. Те же полученные от пациентов образцы использовали в анализе КЗЦ, как показано на фиг. 5;

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

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

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

#### Подробное описание изобретения

Термин "CD38" относится к белку CD38 человека (синонимы: ДЦФ-рибозилциклаза 1, цДЦФр гидролаза 1, циклическая ДЦФ-рибоза-гидролаза 1). Человеческий CD38 имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

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

Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изоформы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

В контексте данного документа "фрагменты антител" относятся к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, фрагмент F(ab)<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области, фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, доменное антитело (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), которое состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкциями антител, с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

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

Переменная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязывающими сайтами".

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

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

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

Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, в котором антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, а каркасы переменной области получены из последовательностей человеческих иммуноглобулинов.

Гуманизованные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не являться точной копией экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или генных последовательностей зародышевой линии.

Термин "адаптированные для человека" антитела или "адаптированные для человеческого каркаса (HFA)" антитела относится к гуманизованным антителам, адаптированным по способам, описанным в патентной публикации США № US 2009/0118127. Адаптированные для человека антитела гуманизируют путем выбора человеческих каркасов-акцепторов на основе максимальных сходств CDR и FR, совместимости длин и сходств последовательностей петель CDR1 и CDR2 и части петель CDR3 легкой цепи.

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

Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепей, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, где вариабельные области антитела получены из системы, в которой применяется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перераспределенные гены иммуноглобулина. Такие системы включают библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши, несущих локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. "Человеческое антитело" может содержать аминокислотные отличия по сравнению с человеческой зародышевой линией или перераспределенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, человеческое антитело по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., *J. Mol. Biol.*, 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., *J. Mol. Biol.*, 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

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

В контексте данного документа "рекомбинантное антитело" включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из организма животного (например, мыши или крысы), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или полученные из него гибридомы (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* путем обмена плеч Fab, такие как биспецифические антитела.

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

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

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

Термины "синергия", "синергизм" или "синергетический" означают эффект комбинации, превышающий ожидаемый аддитивный эффект.

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

Термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно происходить замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, или которое обеспечивает благоприятный или желаемый клинический результат во время лечения заболевания, такого как развитие, рост или распространение опухоли или опухолевых клеток. Благоприятные или желательные клинические результаты включают ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение болезненного состояния

и ремиссию (частичную или полную) как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. Нуждающиеся в лечении включают субъекты, уже имеющие нежелательное физиологическое изменение или заболевание, а также субъекты, склонные к развитию нежелательного физиологического изменения или заболевания.

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

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

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

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

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

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

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

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

"CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль" относится к гематологической злокачественной опухоли, которая характеризуется наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, включая лейкозы, лимфомы и миелому. Примерами таких CD38-положительных гематологических злокачественных опухолей являются В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома из клеток-предшественников и В-клеточная неходжкинская лимфома, острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и новообразования из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома (МКЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), включая высокодифференцированную, умеренно дифференцированную и низкодифференцированную ФЛ, кожная лимфома из клеток центра фолли-

кула, В-клеточная лимфома маргинальной зоны (типа MALT, узловая и селезеночная), лейкоз ворсистых клеток, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ), лимфома Беркитта (BL), плазмцитомы, множественная миелома (ММ), плазмцитарный лейкоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемия Вальденстрема, плазмцитарные лейкозы и анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ).

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

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

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

Другие примеры расстройств, связанных с CD38-экспрессирующими клетками, включают злокачественные опухоли из Т- и NK-клеток, включая новообразования из зрелых Т-клеток и NK-клеток, включая Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, агрессивный лейкоз NK-клеток, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому назального типа, энтеропатийную Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, подкожную panniculit-подобную Т-клеточную лимфому, бластную NK-клеточную

лимфому, фунгоидную гранулему/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные Т-клеточные лимфопролиферативные расстройства (первичную кожную анапластическую крупноклеточную лимфому К-АККЛ, лимфоматоидный папулез, пограничные очаги), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, периферическую неспецифическую Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому.

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

В способах согласно раскрытому в данном документе изобретению, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, можно применять любое анти-CD38 антитело.

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

Вариабельные области анти-CD38 антител можно получить из существующих анти-CD38 антител и клонировать в виде полноразмерных антител или в различные форматы антител с помощью стандартных способов. Типовые вариабельные области, связывающие CD38, которые можно применять, описаны в международных патентных публикациях № WO 05/103083, WO 06/125640, WO 07/042309, WO 08/047242, WO 12/092612, WO 06/099875 и WO 11/154453 A1.

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

SEQ ID NO: 1

MANCFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSIILVLIILVVVLAVVVPWRWQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIH

PEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCKILLWSRIKDLAQFTQVQORDMFTLEDTLGLYLA

DDLTCWCGEFNSTKINYQSCPDRKDCSNNPVSFVFKTVSRRAFAEAACDVVHVMLNGSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEK

VQTLQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR

SEQ ID NO: 2

SKRNIOFSCCKNIYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA

ISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPEVF

DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR

FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEPEVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVFDYWGQGLTIVTSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSL  
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQNVFSCSVMEALHNYHTQ  
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRAATGIP  
ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGOGTKVEIKRTVAAPSVFIAPPDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE  
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Другим типовым анти-CD38 антителом, которое можно применять, является mAb003, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США № 7829693. VH и VL mAb003 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIFPLGIAN  
SAQKFOGRVITITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPFYDWGQGLTIVTSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISWVLAWYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLOPEDFATYYCQOYNSYPRTFGOGTKVEIK

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

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPHDSDAR  
YSPSFQGVTFADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGLTIVTSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPAR  
FSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGOGTKVEIK

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

SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSTNY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAFWGQGLTIVTSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQOKPGQAPVLIYGDSCRPSGIPE  
RFGSNGSNTATLTISGTOAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGKLTIVLQ

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

SEQ ID NO: 20

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFDYWMQVVKQRPQGLEWIGTIYPGDGDTG  
YAQKFOGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 21

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSIITCKASQDVSTVVAWYQOKPGQSPRRLIYSASYRIGVP  
DRFTGSGAGTDFFTITSSVQAEDLAVYYCQOHYSPPYTFGGGKLEIK

Другие типовые анти-CD38, которые можно применять в способах согласно изобретению, включают антитела, описанные в международной патентной публикации № WO 05/103083, международной патентной публикации № WO 06/125640, международной патентной публикации № WO 07/042309, международной патентной публикации № WO 08/047242 или международной патентной публикации № WO 14/178820.

Анти-CD38 антитела, применяемые в способах согласно раскрытому в данном документе изобретению, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, могут также быть выбраны *de novo* из библиотеки фагового дисплея, где фаг сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать человеческие иммуноглобулины или их части, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные вариабельные области антител (Knappik et al., J. Mol. Biol., 296:57-86, 2000; Krebs et al., J. Immunol. Meth., 254:67-84, 2001; Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets et al., PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581, 1991). Вариабельные домены, связывающие CD38, можно выделить, например, из библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде белков, слитых с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в Shi et al., J. Mol. Biol., 397:385-96, 2010 и в международной публикации РСТ № WO 09/085462). Можно проводить скрининг библиотек антител в отношении связывания с внеклеточным доменом человеческого CD38, дополнительно характеризовать полученные положительные клоны, из лизатов клонов выделять Fab и впоследствии клонировать в виде полноразмерных антител. Такое применение способов фагового дисплея для выделения человеческих антител принято в данной области техники. См., например, патент США № 5223409; патент США № 5403484; а также патент США № 5571698, патент США № 5427908, патент США № 5580717, патент США № 5969108, патент США № 6172197, патент США № 5885793; патент США № 6521404; патент США № 6544731; патент США № 6555313; патент США № 6582915; и патент США № 6593081.

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

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

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

В описанных в данном документе способах и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело индуцирует *in vitro* уничтожение СВ38-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ.

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

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

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", или "антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность", или "АЗКЦ" представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например, естественными клетками-киллерами, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством Fc-гамма-рецепторов (FcγR), экспрессируемых на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Гибель покрытых антителами клеток-мишеней, таких как CD38-экспрессирующие клетки, происходит в результате активности эффекторных клеток посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки АЗКЦ-активности анти-CD38 антитела *in vitro* антитело можно добавлять к CD38-экспрессирующим клеткам в комбинации с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. В общем случае цитоллиз обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков). Например, для анализа можно использовать первичные клетки МНК-КМ, выделенные из организма пациента со злокачественной В-клеточной опухолью. В типовом анализе МНК-КМ можно обрабатывать в течение 1 ч анти-CD38 антителом в концентрации 0,3-10 мкг/мл, а выживаемость первичных CD138<sup>+</sup> клеток ММ можно определить методом проточной цитометрии, применяя технологию,

описанную в van der Veer et al., *Haematologica* 96:284-290, 2001 или в van der Veer et al., *Blood Cancer J* 1(10):e41, 2011. Процентную долю лизиса клеток ММ можно определять по сравнению с изотипическим контролем, как описано в данном документе. Анти-CD38 антитела, применяемые в способах согласно изобретению, могут индуцировать АЗКЦ на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% от контроля.

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

Способность моноклональных антител индуцировать АЗКЦ можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. Человеческие IgG1 или IgG3 являются N-гликозилированными в Asn297 с большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, вырабатываемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к Fc-областям, усиливает АЗКЦ антител посредством улучшения связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или КЗЦ-активности. Такие антитела можно получать различными способами, которые, по имеющимся данным, приводят к экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, таких как регулирование осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение вариантной линии CHO Lec13 в качестве клеточной линии-хозяина (Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 277:2 6733-40, 2002), применение вариантной линии клеток CHO EB66 в качестве клеточной линии-хозяина (Olivier et al., *MAbs*;2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве клеточной линии-хозяина (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.*, 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J. Biol. Chem.*, 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 99:652-65, 2008). АЗКЦ, вызываемая анти-CD38 антителами, применяемыми в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6737056. КЗЦ, вызываемая анти-CD38 антителами, применяемыми в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 423, 268, 267 и/или 113 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в Moore et al., *Mabs* 2:181-189, 2010.

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

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

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

Другой вариант реализации изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологию-

ческую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

Другой вариант реализации изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК), при этом анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), причем анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

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

Другой вариант реализации раскрытого в данном документе изобретения, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCKNLYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК).

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

реализации, включая перечисленные ниже пронумерованные варианты реализации, анти-CD38 антитело связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, KRN в области SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 22) в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых раскрытых в данном документе вариантах реализации изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, KRN в области SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 22) в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

Типовым антителом, которое связывается с областью SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1) или как минимум с остатками KRN и VQLT (SEQ ID NO: 22), как показано выше, является даратумумаб, имеющий некоторые последовательности VH, VL и CDR, как описано выше. Антитела, которые связываются с областью SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов, а также как описано в данном документе. Антитела можно дополнительно оценить, например, с помощью анализа конкуренции между даратумумабом и исследуемым антителом за связывание с CD38, как описано выше.

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

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

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

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

"Содержание фукозы" относится к количеству моносахарида фукозы в сахарной цепи в Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур относительно всех гликоструктур. Гликоструктуры могут быть охарактеризованы и количественно оценены множеством способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO 2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественной оценкой с помощью ВЭЖХ (СВЭЖХ) с выявлением флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализа интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой гликанов Asn297 или без нее с помощью Endo S или другого фермента, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, оставляя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщепления mAb на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующего разделения, выявления и количественной оценки с помощью ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); или 5) отделения олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования PNGase F в Asn 297. Высвобожденные олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фа-

зой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

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

Определение "нормальнофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы", применяемое в данном документе, относится к антителам с содержанием фукозы более чем около 50%, как правило, более чем около 60, 70, 80 или более 85%.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Антитела, которые в значительной степени идентичны антителу, содержащему тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13, могут применяться в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации. Употребляемый в данном документе термин "в значительной степени идентичный" означает, что аминокислотные последовательности двух сравниваемых тяжелых цепей или легких цепей антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, не оказывающие отрицательного влияния на свойства антитела. Процентное значение идентичности можно определять, например, путем попарного выравнивания с применением настроек по умолчанию в модуле AlignX программы Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности согласно настоящему изобретению можно применять в качестве поисковой последовательности при осуществлении поиска в общедоступных или патентованных базах данных,

например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для осуществления такого поиска, являются XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Уэстборо, штат Массачусетс, США) с настройками по умолчанию. Типовые замены, которые можно проводить в анти-CD38 антителах, применяемых в способах согласно изобретению, представляют собой, например, консервативные замены аминокислотами, имеющими аналогичный заряд, гидрофобные свойства или стереохимические характеристики. Консервативные замены также можно проводить для улучшения свойств антитела, например стабильности или аффинности, или для улучшения эффекторных функций антитела. Можно делать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, например, в тяжелой или легкой цепи анти-CD38 антитела. Более того, любой нативный остаток в тяжелой или легкой цепи также можно заменять на аланин, как ранее было описано для аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan et al., *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv. Biophys.*, 35:1-24, 1998). Специалисты в данной области могут определить необходимые аминокислотные замены в случае, когда такие замены необходимы. Аминокислотные замены можно проводить, например, с помощью ПЦР-мутагенеза (патент США № 4683195). Библиотеки вариантов можно создавать с помощью хорошо известных способов, например путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например, кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), и скрининга библиотек в отношении вариантов с необходимыми свойствами. Созданные варианты можно исследовать в отношении связывания с CD38, способности индуцировать АЗКЦ, АЗКФ или апоптоз *in vitro* с применением способов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации анти-CD38 антитело представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих анти-CD38 антител или области VL и VH, идентифицированные *de novo*, как описано выше, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ между двумя тяжелыми цепями моноспецифических антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как описанные в патенте США № 7695936; международной патентной публикации № WO 04/111233; патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2007/0287170; международной патентной публикации № WO 2008/119353; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/0286374; патентной публикации США № US 2011/0123532; международной патентной публикации № WO 2011/131746; международной патентной публикации № WO 2011/143545; или патентной публикации США № US 2012/0149876. Дополнительные биспецифические структуры, в которые могут быть встроены области VL и/или VH антител согласно изобретению, могут представлять собой, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация № WO 2009/134776) или структуры, которые включают различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например димеризационные домены "лейциновых молний" или коллагена (международная патентная публикация № WO 2012/022811, патентная публикация США № 5932448; патент США № 6833441).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для того чтобы определить, является ли субъект устойчивым, развилась ли у него устойчивость или он расположен к развитию устойчивости к лечению анти-CD38 антителом или другим терапевтическим агентом, можно применять различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с устойчивостью, включают, например, ухудшение или отсутствие улучшения самочувствия пациента, увеличение размера опухоли, увеличение количества раковых клеток, прекращение или замедление торможения роста опухоли или опухолевых клеток и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Повторное установление ухудшения различных симптомов, связанных с опухолью, также может свидетельствовать о том, что у субъекта развилась или он расположен к развитию устойчивости к анти-CD38 антителу или другому терапевтическому агенту. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьироваться в зависимости от

типа ракового заболевания. Например, симптомы, связанные с В-клеточными злокачественными опухолями, могут включать увеличение лимфатических узлов в шее, пахе или подмышках, жар, ночную потливость, кашель, боль в груди, необъяснимую потерю массы, вздутие живота или боль в животе или чувство переполнения. Ремиссию при злокачественных лимфомах стандартизируют в соответствии с критерием Чесона (Cheson et al., *J. Clin. Oncology*, 25:579-586, 2007), а данное руководство можно использовать, чтобы определить, развилась ли у субъекта устойчивость в анти-CD38 антителу или другому терапевтическому агенту.

В некоторых вариантах реализации описанного в данном документе изобретения и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации субъект, имеющий CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, является гомозиготным в отношении фенилаланина в позиции 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/F) или гетерозиготным в отношении валина и фенилаланина в позиции 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/V). CD16 также известен как Fc-гамма рецептор IIIa (FcγRIIIa) или изоформа III-A низкоаффинного рецептора Fc-области иммуноглобулина гамма. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в позиции остатка 158 белка FcγRIIIa отрицательно влияет на аффинность FcγRIIIa к человеческому IgG. Рецептор с полиморфизмами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V демонстрирует сниженное взаимодействие с Fc и, таким образом, сниженную по сравнению с FcγRIIIa-158V/V АЗКЦ. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах повышает способность антител индуцировать АЗКЦ вследствие улучшенного связывания антител с человеческим FcγRIIIa (CD16) (Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 277:26733-40, 2002). С помощью стандартных способов пациентов можно проанализировать на наличие у них полиморфизма FcγRIIIa.

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

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

Введение/фармацевтические композиции.

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

Способом введения анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное или подкожное, ингаляционное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), или другие средства, известные специалисту, как хорошо известно в данной области техники.

Анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно вводить пациенту

любым приемлемым путем, например парентерально посредством внутривенной (в.в.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно или подкожно, или внутрибрюшинно. В.в. инфузию можно осуществлять в течение более, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

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

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

Введение анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде постоянного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, анти-CD38 антитело в способах согласно изобретению можно вводить в дозе 8 или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

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

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

Анти-CD38 антитела в способах согласно изобретению и в некоторых вариантах реализации всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов реализации также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, отложить начало появления признаков прогрессирования рака и/или снизить риск повторного появления в случае ремиссии рака. В особенности это целесообразно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

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

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

ПТРК может предоставляться в дозировке 45 мг/м<sup>2</sup>/день ПО или 25 мг/м<sup>2</sup>/день ПО.

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

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

такой как винкристин, или антрациклин, такой как доксорубицин.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты реализации изобретения будут дополнительно раскрыты в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

Дополнительные варианты реализации изобретения.

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

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

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

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

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

- a) антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ);
- b) комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ); или
- c) как АЗКЦ, так и КЗЦ *in vitro*.

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

6) Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4 или 5, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4 или 5 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-5, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

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

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

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

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

11) Анти-CD38 антитело для применения в соответствии с вариантом реализации 1, 4-10, ПТРК для применения в соответствии с вариантом реализации 2, 4-10 или комбинация для применения в соответствии с вариантом реализации 3-10, причем:

- a) анти-CD38 антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4;
- b) анти-CD38 антитело конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;
- c) анти-CD38 антитело связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1);
- d) анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;
- e) анти-CD38 антитело содержит последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;

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

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

h) анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13;

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

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

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

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

Пример 1. Общие способы.

Антитела и реагенты.

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

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

LUC-трансдуцированные клеточные линии MM совместно культивировали с эффекторными клетками (свежевыделенными из организма здоровых доноров МКПК) при соотношении эффектор:мишень 1:25 в белых непрозрачных 96-луночных планшетах с плоским дном (Costar) в присутствии даратумумаба (0,001, 0,01, 0,1 и 1,0 мкг/мл) в течение 4 ч. Затем методом БЛВ определяли выживаемость клеток LUC<sup>+</sup>-MM через 10 мин после добавления субстрата люциферина (125 мкг/мл; Promega). Лизис клеток MM определяли с помощью следующей формулы:

$$\% \text{ лизиса} = 1 - \left( \frac{\text{средний сигнал БЛВ в присутствии эффекторных клеток и даратумумаба}}{\text{средний сигнал БЛВ в присутствии эффекторных клеток и контрольного антитела}} \right) \times 100\%.$$

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

Даратумумаб (0, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 и 3,0 мкг/мл) добавляли к клеточным линиям MM в среде, дополненной смешанной человеческой сывороткой (10%; Sanquin) или инактивированной нагреванием человеческой сывороткой. После 1 ч инкубации при 37°C методом БЛВ определяли клеточный лизис через 10 мин после добавления люциферина (125 мкг/мл) и рассчитывали с помощью следующей формулы:

$$\% \text{ лизиса} = 1 - \left( \frac{\text{средний сигнал БЛВ в присутствии нативной человеческой сыворотки}}{\text{средний сигнал БЛВ в присутствии инактивированной нагреванием человеческой сыворотки}} \right) \times 100\%.$$

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

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

$$\% \text{ лизиса клеток} = 1 - \left( \frac{\text{абсолютное число выживших клеток CD138}^+ \text{ в обработанных лунках}}{\text{абсолютное число выживших клеток CD138}^+ \text{ в контрольных лунках}} \right) \times 100\%.$$

Иммунофенотипирование методом проточной цитометрии.

Методом анализа проточной цитометрии определяли экспрессию нескольких белков клеточной поверхности, применяя FITC-, PE-, Per-CP- или APC-конъюгированные моноклональные антитела. Анти-CD38, анти-CD138 и анти-CD56 приобрели у Beckman Coulter; анти-CD3, анти-CD16, анти-CD55, анти-CD59 у BD Biosciences; и анти-CD46 у Biolegend. Проточную цитометрию осуществляли с помощью устройства FACS-Calibur (Becton Dickinson); данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest.

Статистика.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

На фиг. 3А, 3В и 3С проиллюстрированы результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ и АЗКЦ в клеточных линиях XG1, RPMI8226 и UM9 соответственно.

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

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

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

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

пациентов образцам соответственно.

В первичных клетках ММ предварительная обработка ПТРК в течение 48 ч приводила к существенному повышению из восприимчивости к даратумумаб-опосредованной КЗЦ у 13 из 16 пациентов (данные не показаны) и АЗКЦ у 8 из 11 пациентов (данные не показаны). Объединенные результаты по этим пациентам показывают, что ПТРК улучшает КЗЦ, опосредованную 10 мкг/мл даратумумаба в среднем от 16,1 до 43,9% ( $P < 0,0001$ ) (фиг. 4А), а АЗКЦ, опосредованная 10 мкг/мл даратумумаба была улучшена ПТРК в среднем от 25,1 до 39,5% ( $P=0,0315$ ) (фиг. 4В).

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

Фиг. 6 иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной АЗКЦ в первичных клетках ММ от каждого пациента. Фиг. 6А иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 3 и пациента 4. Фиг. 6В иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 7 и пациента 8. Фиг. 6С иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 9 и пациента 10. Фиг. 6D иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 14 и пациента 15. Фиг. 6Е иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 16 и пациента 17. Фиг. 6f иллюстрирует результаты даратумумаб-индуцированной КЗЦ в первичных клетках ММ от пациента 18. ПТРК индуцировала даратумумаб-опосредованную АЗКЦ в большинстве исследуемых первичных клеток ММ. Эти первичные клетки ММ были выделены из организма пациентов с рефрактерным или вдвойне рефрактерным заболеванием, как указано в таблице.

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

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

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

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

Тип легкой цепи	К	К	Л	К	Л	Л
<b>Предыдущая терапия</b>						
Предыдущие линии терапии (число)	10	4	4	6	3	0
Предыдущая трансплантация стволовых клеток	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Аутологичных	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Аллогенных	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Предыдущее лечение леналидомидом	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
рефрактерный статус к леналидомиду*	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Предыдущее лечение бортезомибом	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
рефрактерный статус к бортезомибу*	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Экспрессия CD38 на клетках ММ (СИФ)	1258	1346	764	1275	2642	1134
Экспрессия CD46 на клетках ММ (СИФ)	1165	264	866	1346	661	1124
Экспрессия CD55 на клетках ММ (СИФ)	610	119	552	227	1	594
Экспрессия CD59 на клетках ММ (СИФ)	235	62	228	108	7	90
<b>Пациент</b>						
<b>Параметр :</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
Возраст (лет)	55	64	75	63	56	59
Пол	Ф	М,	М,	Ф	М,	М,
Тип моноклональной тяжелой цепи	IgA	-	-	IgA	IgA	-
Тип легкой цепи	Л	К	Л	К	К	К
<b>Предыдущая терапия</b>						
Предыдущие линии терапии (число)	2	2	5	6	2	4
Предыдущая трансплантация стволовых клеток	Да	Да	Нет	Да	Да	Да
Аутологичных	Да	Да	Нет	Да	Да	Да
Аллогенных	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Предыдущее лечение леналидомидом	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
рефрактерный статус к леналидомиду*	Нет	Да	Да	Да	Нет	Да
Предыдущее лечение бортезомибом	Да	Да	Да	Да	Нет	Да
рефрактерный статус к бортезомибу*	Да	Нет	Да	Да	Нет	Нет
Экспрессия CD38 на клетках ММ (СИФ)	1999	578	1252	1310	843	64

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

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

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

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

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

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

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

Гибридные структуры, состоящие из 2-3 мм двухфазных частиц фосфата кальция покрывали in vitro человеческими мезенхимальными стромальными клетками (МСК;  $2 \times 10^5$  клеток/структуру). Через неде-

лю *in vitro* культивирования в остеогенной среде гуманизированные структуры подкожно имплантировали мышам RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma_c$ <sup>-/-</sup>, как было описано ранее (Groen et al., Blood., 19;120:e9-e16, 2012; de Haart et al., Clin. Cancer Res., 19:5591-5601, 2013).

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

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, имеющего рефрактерную или устойчивую CD38-положительную множественную миелому (ММ), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (АТРА), где анти-CD38 антитело содержит последовательности, определяющие комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и последовательности, определяющие комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и где субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению анти-CD38 антителом или комбинации по меньшей мере из одного химиотерапевтического агента и анти-CD38 антитела.

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

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

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

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид, бортезомиб, мелфалан, дексаметазон или талидомид.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой леналидомид или бортезомиб.

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

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело имеет изотип IgG1.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что антитело связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что анти-CD38 антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

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

12. Способ по п.1, где введение субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с АТРА приводит к индукции комплемент-зависимой цитотоксичности или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности

анти-CD38 антитела.

13. Способ по п.1, где введение субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с ATRA приводит к усилению индуцированной анти-CD38 антитела зависимой от комплемента цитотоксичности анти-CD38 антитела.

14. Способ по п.1, где введение субъекту анти-CD38 антитела в комбинации с ATRA приводит к замедлению роста опухоли у субъекта.

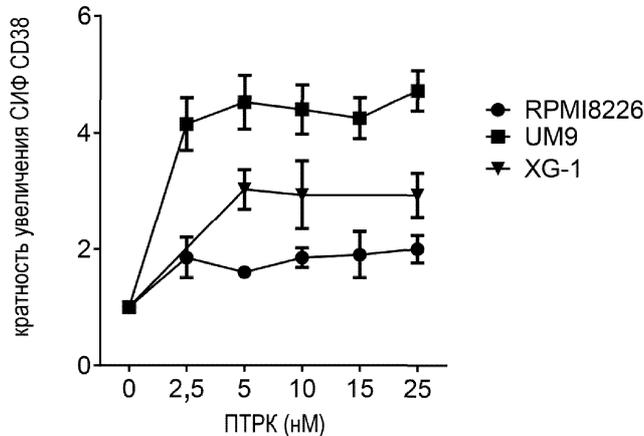
15. Способ усиления анти-CD38-индуцированной комплемент-зависимой цитотоксичности у субъекта, имеющего рефрактерную или устойчивую CD38-позитивную множественную миелому, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой,

где анти-CD38 антитело содержит последовательности, определяющие комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и последовательности, определяющие комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и

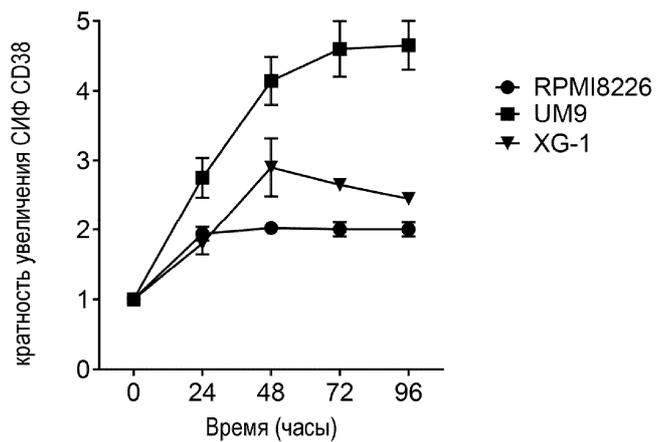
где субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, анти-CD38 антителом или комбинацией по меньшей мере из одного химиотерапевтического агента и анти-CD38 антитела.

16. Способ индуцирования анти-CD38-антитело-опосредованной цитотоксичности у субъекта, имеющего рефрактерную или устойчивую CD38-позитивную множественную миелому, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, анти-CD38 антитела в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой, где анти-CD38 антитело содержит последовательности, определяющие комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и последовательности, определяющие комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и где субъект устойчив или имеет приобретенную устойчивость к лечению по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, антителом против CD38 или комбинацией по меньшей мере из одного химиотерапевтического агента и анти-CD38 антитела и, дополнительно, где цитотоксичность представляет собой комплемент-зависимую цитотоксичность или антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.

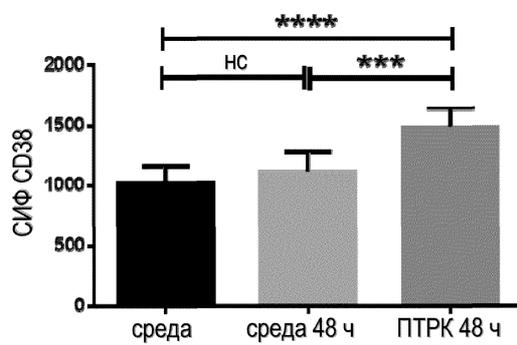
17. Способ по п.16, где цитотоксичность является комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ).



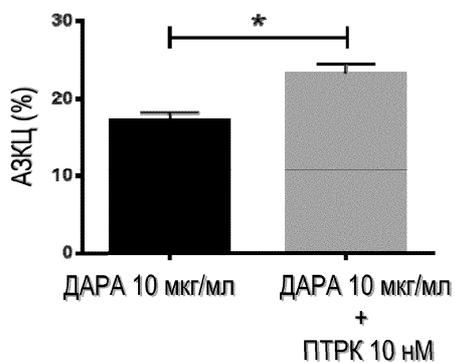
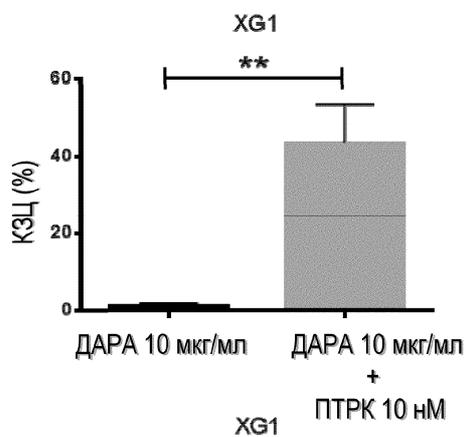
Фиг. 1А



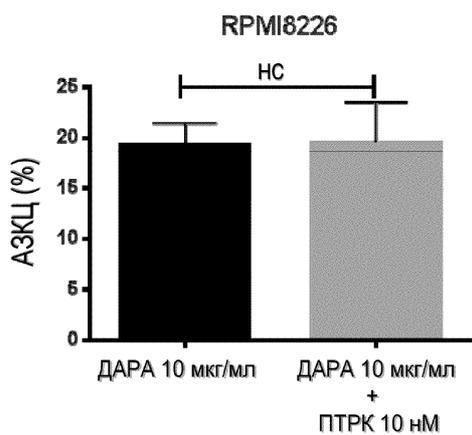
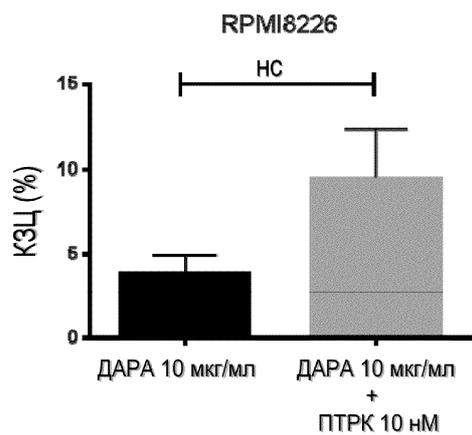
Фиг. 1В



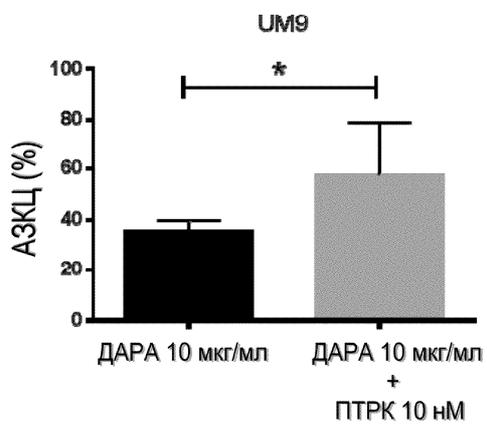
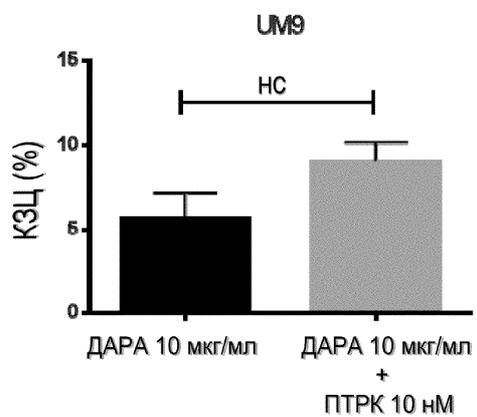
Фиг. 2



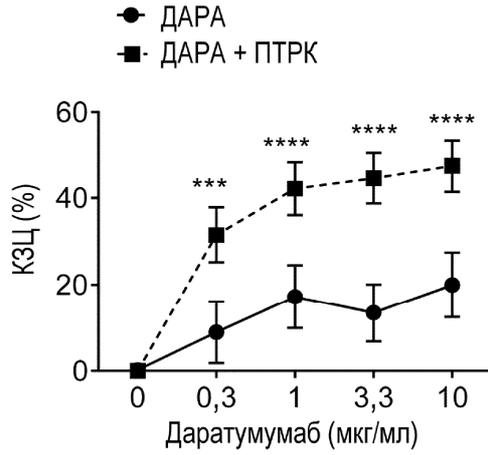
Фиг. 3А



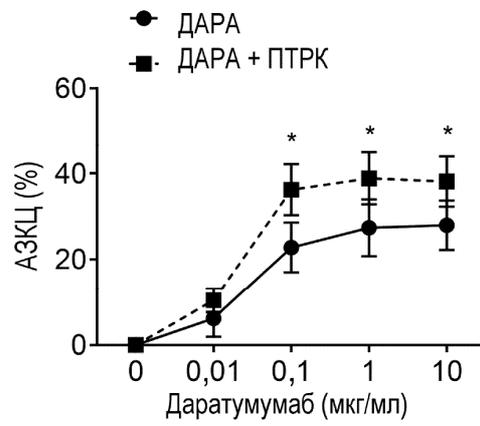
Фиг. 3В



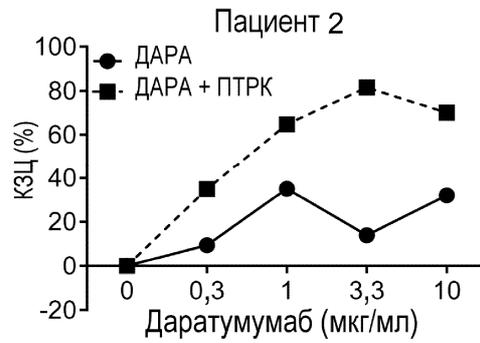
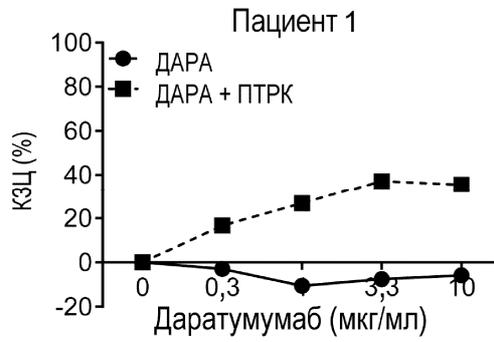
Фиг. 3С



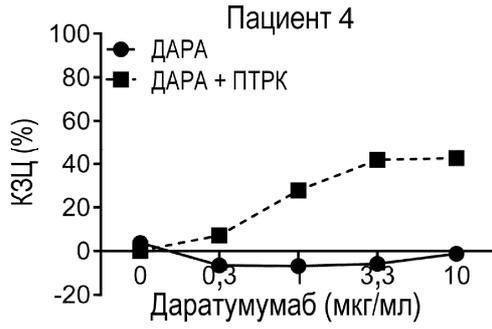
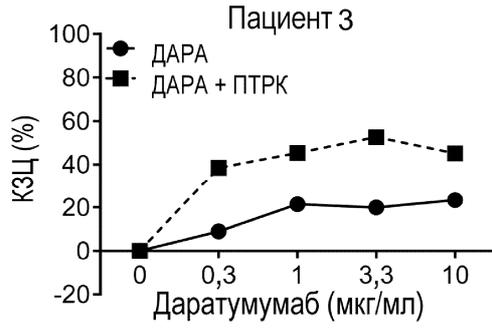
Фиг. 4А



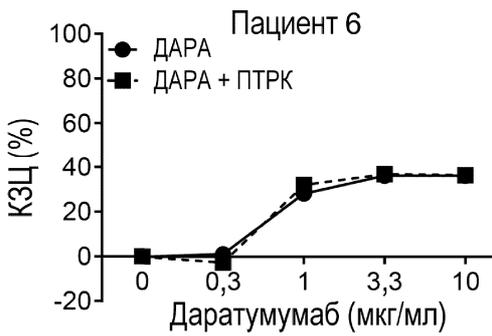
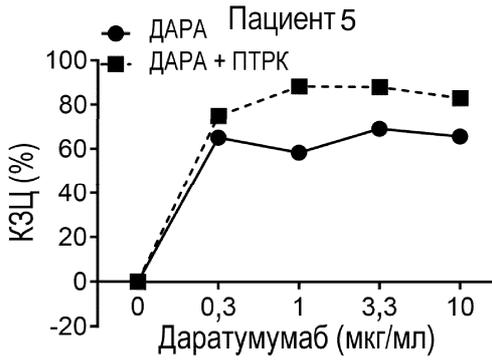
Фиг. 4В



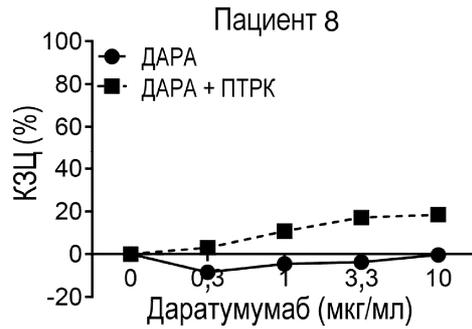
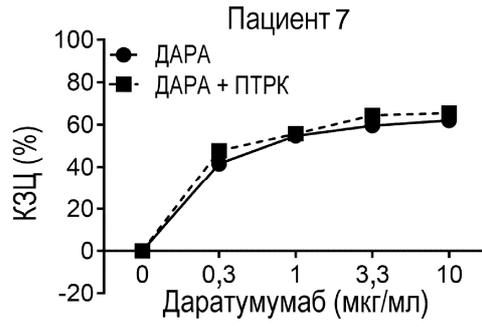
Фиг. 5А



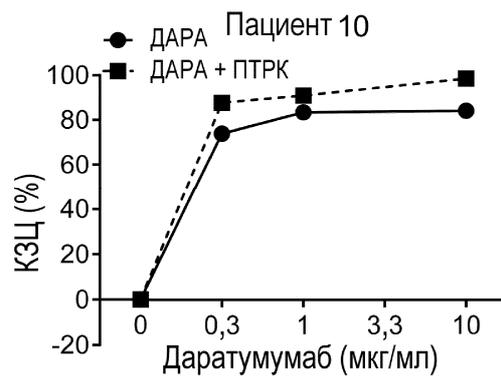
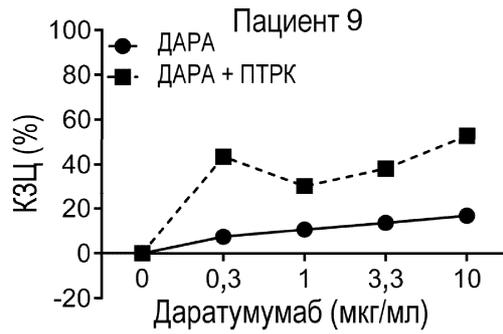
Фиг. 5В



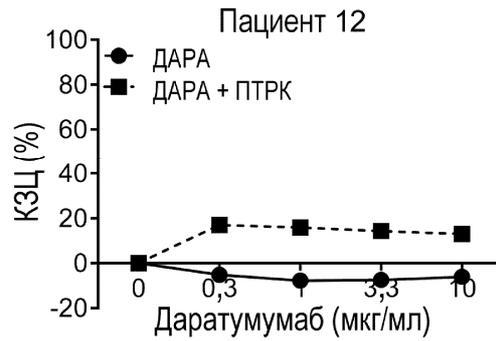
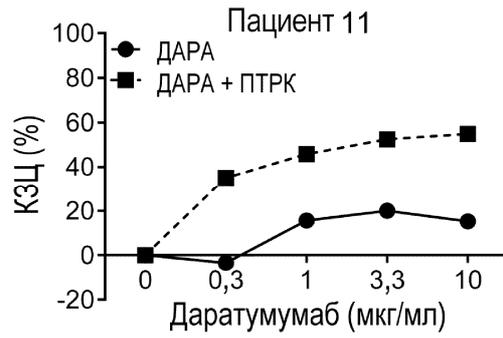
Фиг. 5С



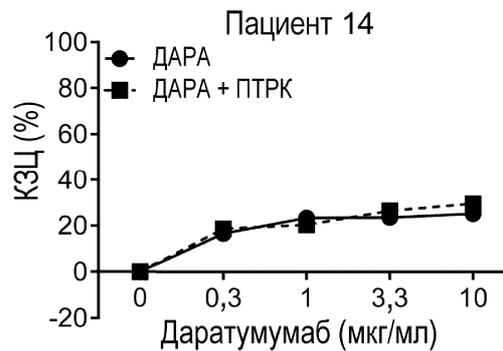
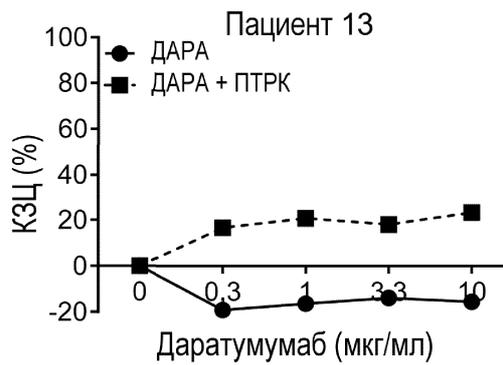
Фиг. 5D



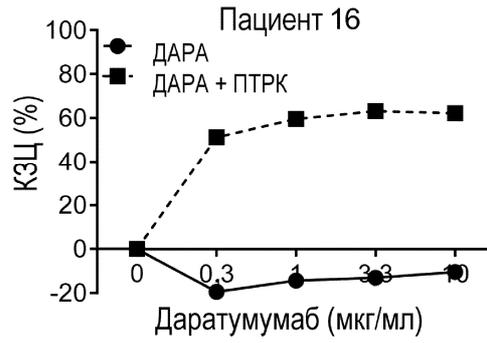
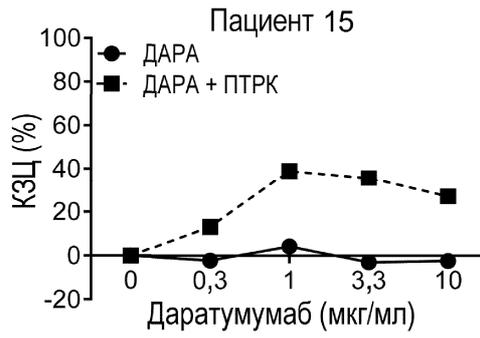
Фиг. 5E



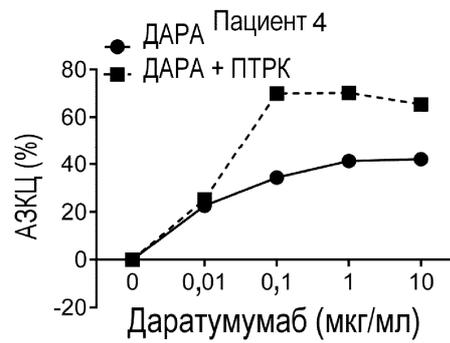
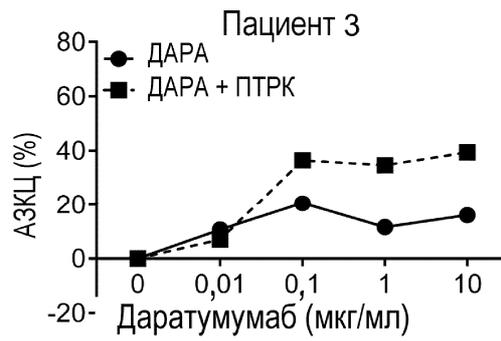
Фиг. 5F



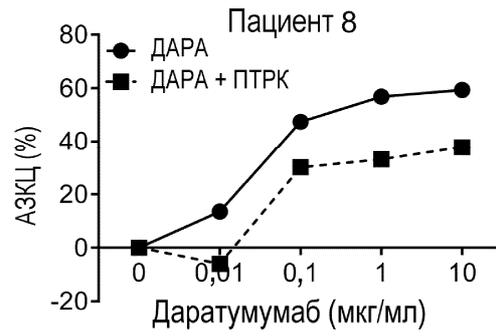
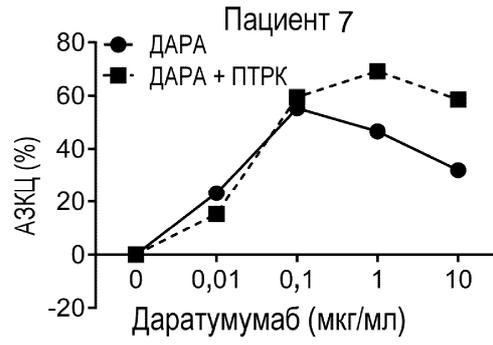
Фиг. 5G



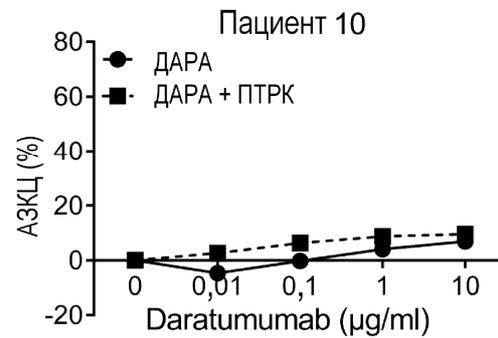
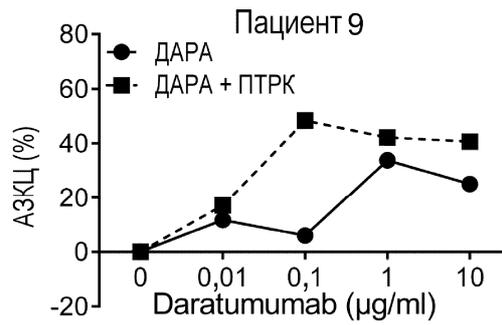
Фиг. 5Н



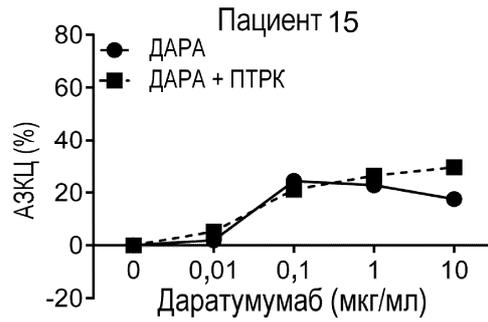
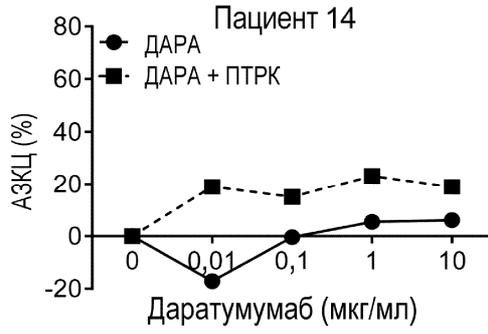
Фиг. 6А



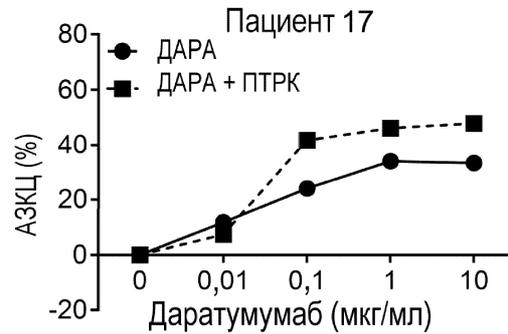
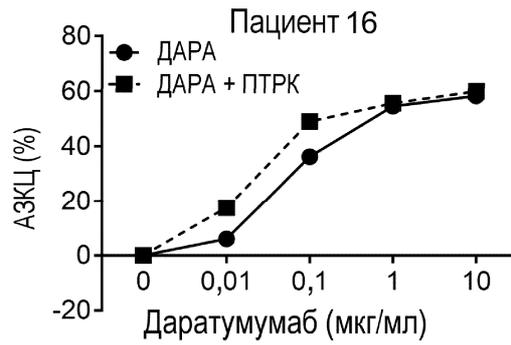
Фиг. 6В



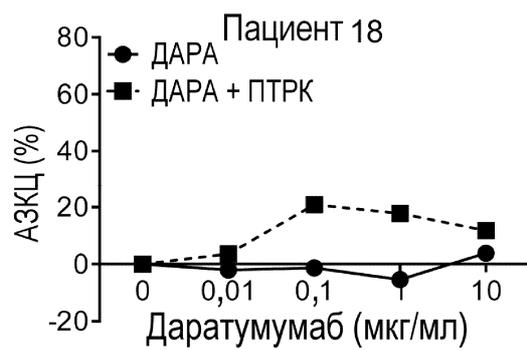
Фиг. 6С



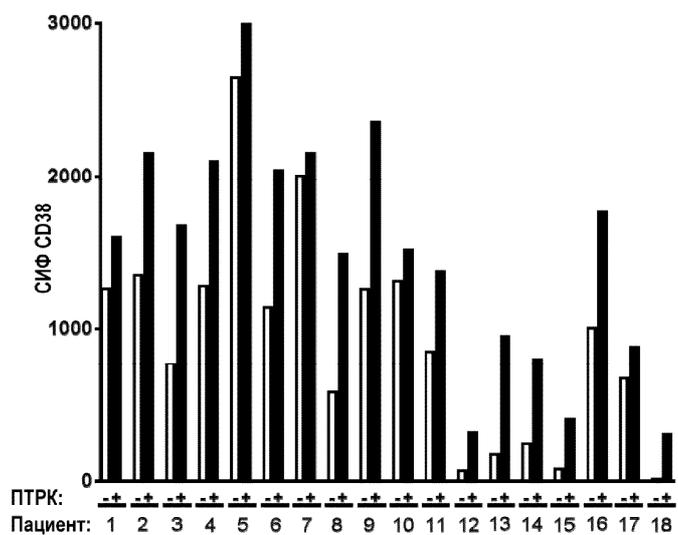
Фиг. 6D



Фиг. 6E

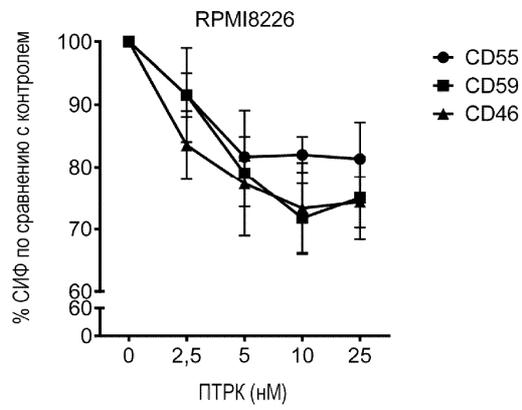
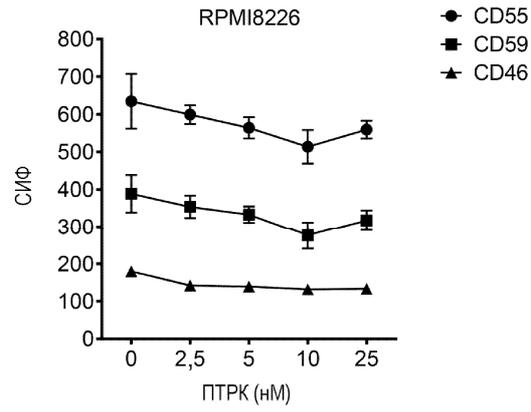


Фиг. 6F

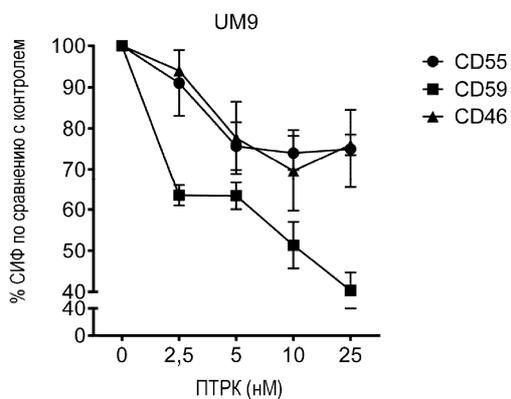
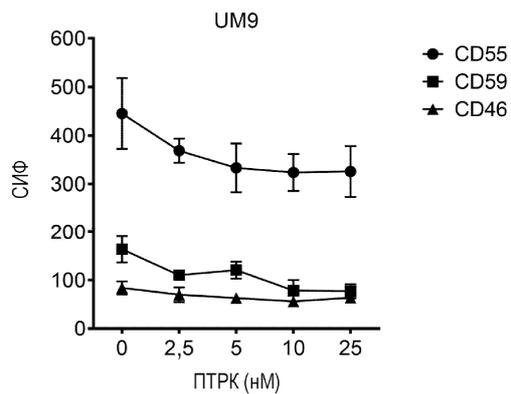


Фиг. 7

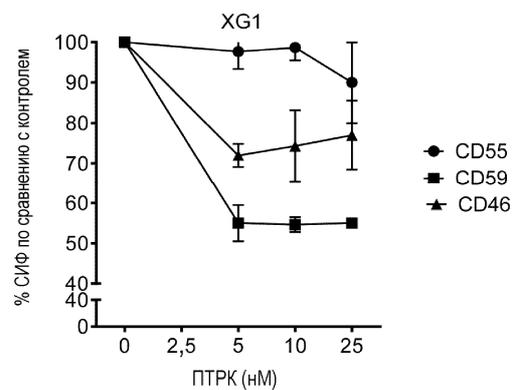
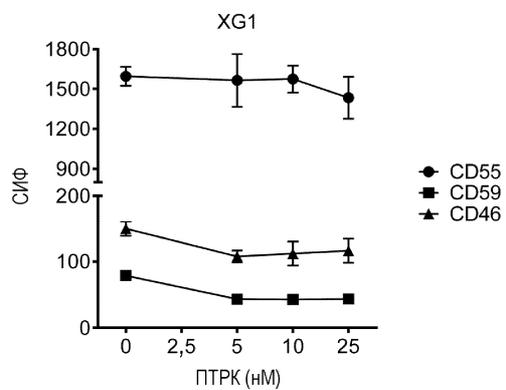
035979



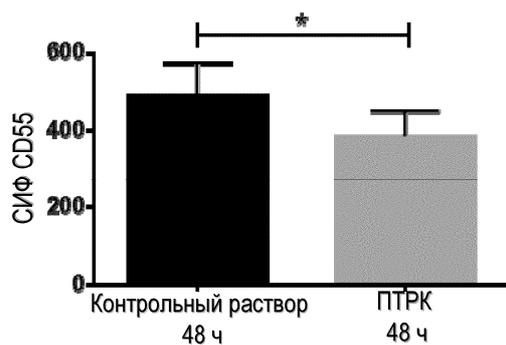
Фиг. 8А



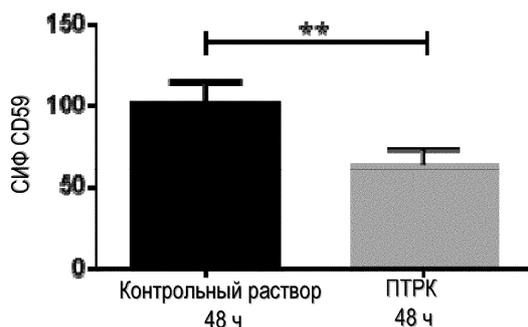
Фиг. 8В



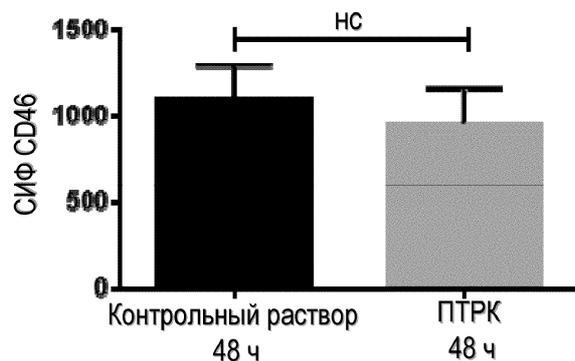
Фиг. 8С



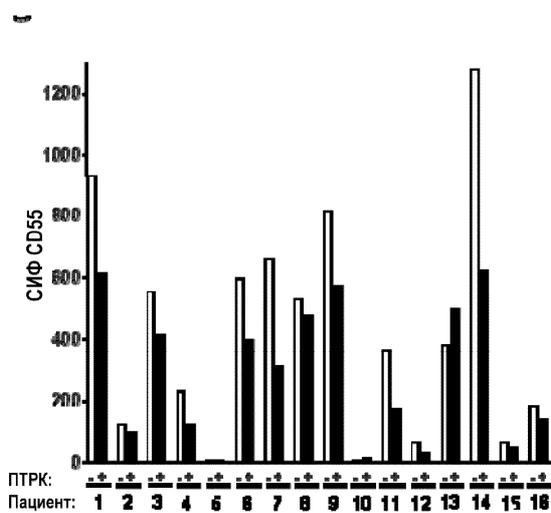
Фиг. 9А



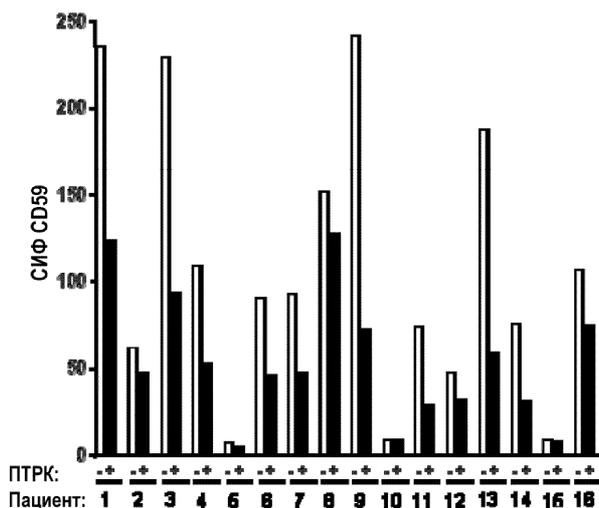
Фиг. 9В



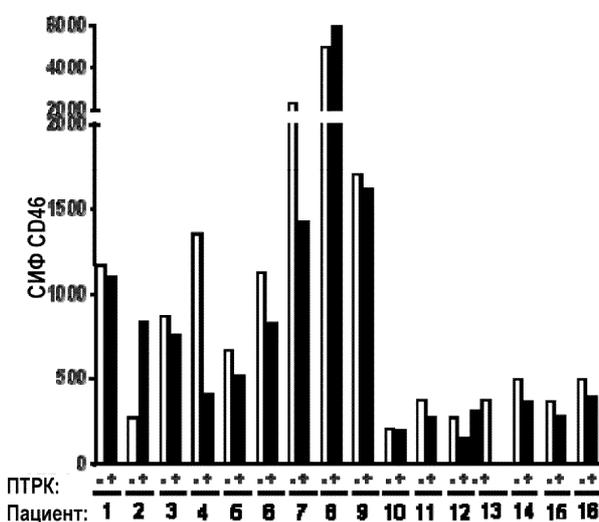
Фиг. 9С



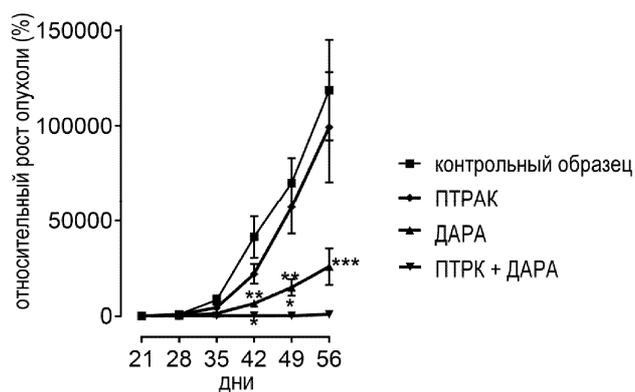
Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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