

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036789

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.22

(21) Номер заявки
201890093

(22) Дата подачи заявки
2016.06.22

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ АНТИТЕЛАМИ К CD38 И
ИНГИБИТОРАМИ СУРВИВИНА

(31) 62/182,699; 62/319,036

(32) 2015.06.22; 2016.04.06

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/US2016/038702

(87) WO 2016/209921 2016.12.29

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

(72) Изобретатель:
Доши Парул (US), Локхорст Хенк М.,
Мюгис Тюна (NL)

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

(56) US-A1-20140155584

WAGNER et al., Preclinical efficacy of
sepantronium bromide (YM155) in multiple myeloma
is conferred by down regulation of Mcl-1, Oncotarget,
15 November 2014, vol 5, No 21, pp. 10237-50.
Especially abstract; p. 10238, col 1, para 4
US-A1-20040268425

(57) Изобретение относится к комбинированной терапии гемобластозов антителами к CD38 и
ингибиторами сурвивина.

036789 B1

036789 B1

036789

B1

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированным типам лечения гемобластозов.

Предпосылки создания изобретения

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.

Доступные на данный момент варианты лечения ММ включают в себя схемы химиотерапии, трансплантацию стволовых клеток, THALOMID® (талидомид), REVLIMID® (леналидомид), POMALYST® (помалидомид), VELCADE® (бортезомиб), KYPROLIS® (карфилзомиб), FARADYK® (панобиностат), AREDIA® (памидронат) и ZOMETA® (золедроновую кислоту). Современные протоколы лечения, которые включают комбинацию химиотерапевтических препаратов, таких как винкристин, БХНМ, мелфалан, циклофосфамид, адриамицин и преднизон или дексаметазон, обеспечивают уровень полной ремиссии, составляющий только около 5%, а медианное время выживания с момента постановки диагноза составляет приблизительно 36-48 месяцев. Последние достижения с применением высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичного костного мозга или моноклеарных клеток периферической крови увеличили частоту полной ремиссии и длительность ремиссии. Тем не менее общая выживаемость возросла лишь незначительно и не было получено данных об излечении. В конечном итоге у всех пациентов с ММ наблюдался рецидив даже в случае применения поддерживающей терапии интерфероном-альфа (IFN- α) самостоятельно или в комбинации со стероидами.

Эффективность доступных режимов лекарственного лечения ММ ограничена низкой скоростью пролиферации клеток, а развитие устойчивости к лекарственным средствам наблюдается у вплоть до 90% пациентов. Хромосомные транслокации, онкогенные мутации, нарушение регуляции сигнальных путей, таких как антиапоптозный путь и путь выживания, и ниша костного мозга вовлечены в развитие устойчивости к лекарственным средствам при ММ (см. обзорную статью Abdi et al., Oncotarget 4:2186-2207, 2013). Ниша костного мозга (КМ) участвует в пролиферации, выживании, дифференцировке, миграции и устойчивости к лекарственным средствам злокачественных плазмочитов (Manier et al., J Biomed Biotechnol 2012; опубликована онлайн 3 октября 2012 г., doi: 10.1155/2012/157496).

CD38, трансмембранный гликопротеин II типа, представляет собой перспективную мишень для терапевтических антител при различных гемобластозах, включая множественную миелому. Антитела к CD38 описаны, например, в международной патентной публикации № WO2008/037257, международной патентной публикации № WO 2008/047242 и международной патентной публикации № WO2007/042309, и оцениваются в клинических условиях в отношении их эффективности при множественной миеломе и других гемобластозах.

Изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38 и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А. Стромальные клетки костного мозга (BMSC) опосредуют защиту от уничтожения клеток множественной миеломы (ММ) посредством ADCC, индуцированной антителом к CD38 (даратумумаб), в линиях клеток ММ. CD38+ клетки ММ UM9 с трансдуцированным геном люциферазы культивировали в присутствии или в отсутствие BMSC здорового донора (HD-BMSC) в течение 16 ч перед инкубацией с даратумумабом и HD-PBMC в нескольких последовательных концентрациях с соотношением клеток PBMC: ММ, равном 30:1. Жизнеспособность клеток ММ определяли через 4 ч посредством биолуминесцентной визуализации (BLI). Процентную долю (%) ADCC рассчитывали по отношению к жизнеспособности клеток без даратумумаба. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM) трех измерений. Данные представляют результаты 3 независимых экспериментов. Различия между культурами, в которых присутствуют или отсутствуют BMSC, проверяли с использованием непарного t-критерия $*=p < 0,05$.

Фиг. 1В. Стромальные клетки костного мозга (BMSC) опосредуют защиту от уничтожения клеток множественной миеломы (ММ) посредством ADCC, индуцированной антителом к CD38 (даратумумаб), в линиях клеток ММ. CD38+ клетки ММ RPMI8226 с трансдуцированным геном люциферазы культивировали в присутствии или в отсутствие HD-BMSC в течение 16 ч перед инкубацией с даратумумабом и HD-PBMC в нескольких последовательных концентрациях с соотношением клеток PBMC: ММ, равном 30:1. Жизнеспособность клеток ММ определяли через 4 ч посредством BLI. Процентную долю (%) ADCC рассчитывали по отношению к жизнеспособности клеток без даратумумаба. Планки погрешно-

стей обозначают SEM трех измерений. Данные представляют результаты 3 независимых экспериментов. Различия между культурами, в которых присутствуют или отсутствуют BMSC, проверяли с использованием непарного t-критерия $*=p < 0,05$.

Фиг. 2А. BMSC опосредуют защиту от уничтожения клеток MM посредством ADCC, индуцированной антителом к CD38 (даратумумаб), в образцах, полученных от пациента с первичной MM. Полные аспираты костного мозга, полученные от пациента 1 с MM, культивировали в присутствии (белые столбики) или в отсутствие (черные столбики) аутологичных стромальных клеток костного мозга, а впоследствии обрабатывали даратумумабом в указанных концентрациях. Аутологичные клетки, присутствующие в аспирате, использовали в качестве эффекторных клеток. Поскольку BM-MNC уже содержат в качестве эффекторных клеток NK-клетки, других эффекторных клеток не добавляли. Жизнеспособность CD138+ клеток MM в культурах определяли через 24 ч посредством проточной цитометрии. Планки погрешностей обозначают SEM трех измерений. Различия между культурами, в которых присутствуют или отсутствуют BMSC, проверяли с использованием непарного t-критерия. $*=p < 0,05$. Верхняя панель: пациент № 1, нижняя панель; пациент № 2. BMSC: стромальная клетка костного мозга. ADCC: антителозависимая клеточная цитотоксичность.

Фиг. 2В. BMSC опосредуют защиту от уничтожения клеток MM посредством ADCC, индуцированной антителом к CD38 (даратумумаб), в образцах, полученных от пациента с первичной MM. Полные аспираты костного мозга, полученные от пациента 2 с MM, культивировали в присутствии (белые столбики) или в отсутствие (черные столбики) аутологичных стромальных клеток костного мозга, а впоследствии обрабатывали даратумумабом в указанных концентрациях. Аутологичные клетки, присутствующие в аспирате, использовали в качестве эффекторных клеток. Поскольку BM-MNC уже содержат в качестве эффекторных клеток NK-клетки, других эффекторных клеток не добавляли. Жизнеспособность CD138+ клеток MM в культурах определяли через 24 ч посредством проточной цитометрии. Планки погрешностей обозначают SEM трех измерений. Различия между культурами, в которых присутствуют или отсутствуют BMSC, проверяли с использованием непарного t-критерия. $*=p < 0,05$. Верхняя панель: пациент № 1, нижняя панель; пациент № 2. BMSC: стромальная клетка костного мозга. ADCC: антителозависимая клеточная цитотоксичность.

Фиг. 3. YM155 не вызывает лизис NK-клеток. HD-PBMC и мононуклеарные клетки костного мозга (BMMNC) пациента инкубировали с указанными концентрациями YM155 в течение 24 ч. Число жизнеспособных CD3- CD56+ NK-клеток определяли посредством проточной цитометрии, а процентную долю лизированных клеток рассчитывали, используя необработанные образцы в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 4А. Даратумумаб в комбинации с YM155 оказывает синергетическое действие на уничтожение клеток MM посредством ADCC в присутствии стромальных клеток. Клетки MM RPMI8226 с трансдуцированным геном люциферазы культивировали в присутствии или в отсутствие HD-BMSC. Даратумумаб и YM155 добавляли в указанных концентрациях. В качестве источника NK-клеток для индукции ADCC в лунки добавляли HD-PBMC с соотношением PBMC:MM 40:1. Жизнеспособность клеток RPMI8226 определяли через 4 ч посредством BLI. Процентную долю (%) лизированных клеток рассчитывали по отношению к выживаемости клеток RPMI8226, которые не получали никакой обработки. При комбинировании YM155 и даратумумаба ожидаемые показатели лизиса отнимали от значений, полученных при обработке даратумумабом и YM155 по отдельности, с допущением, что кумулятивный эффект является аддитивным, но не синергетическим. Статистические различия между ожидаемыми и наблюдаемыми результатами определяли с использованием парного t-критерия $***=P < 0,005$, $*=P < 0,05$. ДАРА: даратумумаб.

Фиг. 4В. Даратумумаб в комбинации с YM155 оказывает синергетическое действие на уничтожение первичных клеток MM посредством ADCC в присутствии стромальных клеток. Полные аспираты КМ, полученные от пациента 1 с MM, культивировали в присутствии или в отсутствие аутологичных MM-BMSC. Даратумумаб и YM155 добавляли в указанных концентрациях. Так как BM-MNC содержат достаточное число NK-клеток (в обоих случаях с отношением NK-клеток к клеткам MM приблизительно 30:1), других эффекторных клеток не добавляли. Через 24 ч жизнеспособные CD138+ клетки MM подсчитывали в каждом состоянии посредством проточной цитометрии. Процентную долю (%) лизированных клеток рассчитывали по отношению к выживаемости клеток MM в BM-MNC, которые культивировали в аналогичных условиях, но не обрабатывали никакими лекарственными средствами. Статистические различия между ожидаемыми и наблюдаемыми результатами определяли с использованием парного t-критерия. $*=P < 0,05$.

Фиг. 4С. Даратумумаб в комбинации с YM155 оказывает синергетическое действие на уничтожение первичных клеток MM посредством ADCC в присутствии стромальных клеток. Полные аспираты КМ, полученные от пациента 2 с MM, культивировали в присутствии или в отсутствие аутологичных MM-BMSC. Даратумумаб и YM155 добавляли в указанных концентрациях. Так как BM-MNC содержат достаточное число NK-клеток (в обоих случаях с отношением NK-клеток к клеткам MM приблизительно 30:1), других эффекторных клеток не добавляли. Через 24 ч жизнеспособные CD138+ клетки MM под-

считывали в каждом состоянии посредством проточной цитометрии. Процентную долю (%) лизированных клеток рассчитывали по отношению к выживаемости клеток ММ в ВМ-MNC, которые культивировали в аналогичных условиях, но не обрабатывали никакими лекарственными средствами. Статистические различия между ожидаемыми и наблюдаемыми результатами определяли с использованием парного t-критерия. $*=P < 0,05$.

Фиг. 4D. Даратумумаб в комбинации с YM155 оказывает синергетическое действие на уничтожение первичных клеток ММ посредством ADCC в присутствии стромальных клеток.

Мононуклеарные клетки костного мозга (ВМ-MNC), полученные от пациентов с ММ, содержащие CD138+ клетки ММ (45, 5,5, 10,2, 21,6% для пациентов 1-4 соответственно), культивировали в присутствии или в отсутствие аутологических ММ-BMSC. Добавляли даратумумаб (1 нг/мл) и соответствующие субмаксимальные концентрации YM155 (125, 62, 75 и 50 нг/мл для пациентов 1-4 соответственно). Так как ВМ-MNC содержали достаточное число NK-клеток (7,9, 7,9, 10,3 и 9,5% соответственно), других эффекторных клеток не добавляли. Через 24 ч жизнеспособные CD138+ клетки ММ подсчитывали в каждом состоянии посредством проточной цитометрии. Процентную долю (%) лизированных клеток рассчитывали по отношению к выживаемости клеток ММ в ВМ-MNC, которые культивировали в аналогичных условиях, но не обрабатывали никакими лекарственными средствами. Статистические различия между ожидаемыми и наблюдаемыми результатами определяли с использованием парного t-критерия. $*=P < 0,05$, ns: не значимый. ДАРА: даратумумаб.

Фиг. 5. Противоопухолевый эффект комбинированной терапии даратумумабом и YM155. Анализ опухолевой нагрузки в каждой терапевтической группе мышей RAG2-/- γ c-/-, которым имплантировали клетки UM9. Гибридные каркасы, покрытые человеческими MSC и нагруженные клетками ММ линии UM9 с трансдуцированным геном люциферазы, имплантировали подкожно в спину мышей RAG2-/- γ c-/- (4 каркаса на одну мышь). Через десять дней после имплантации растущие опухоли визуализировали и количественно оценивали посредством BLI. Впоследствии различные группы мышей (n=4) либо лечили контрольной несущей средой (контроль), либо лечили даратумумабом, YM155 или даратумумабом плюс YM155, как указано. YM155 (или его несущую среду, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)) доставляли с помощью подкожных инфузионных насосов со скоростью 1 мг/кг/сутки YM155 в течение 10 суток. Каждая мышь, включая таковых из контрольной группы, получала обедненные по Т-клеткам HD-RBMC (5 $\times$ 10⁶ клеток) в качестве источника человеческих NK-клеток для индукции ADCC. Мышей отслеживали еженедельно посредством BLI. Результаты выражены в виде средней опухолевой нагрузки в каждом каркасе. Планки погрешностей обозначают SEM. Статистическую разницу между мышами, леченными даратумумабом, и мышами, леченными даратумумабом плюс YM155, рассчитывали, используя U-критерий Манна-Уитни.

*** $P < 0,001$.

Подробное описание изобретения

Термин "CD38" относится к белку CD38 человека (синонимы: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФ-гидролаза 1, циклическая АДФ-рибозогидролаза 1). Человеческий CD38 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1. Хорошо известно, что CD38 представляет собой одноцепочечный белок мембраны типа II с аминокислотными остатками 1-21, представляющими цитозольный домен, аминокислотными остатками 22-42, представляющими трансмембранный домен, и остатками 43-300, представляющими внеклеточный домен CD38.

Термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, включающие мышьиные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также 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 подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "фрагменты антитела" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент F(ab)₂ - бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмент доменного антитела (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 configura-

ций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными конструктами одноцепочечными 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 полноразмерных антител.

Словосочетание "выделенное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, по существу не содержащие других антител, имеющих отличные виды антигенной специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, по существу не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от человеческого CD38). Однако выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как ортологи CD38 человека, например CD38 *Macaca fascicularis* (яванского макака). Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Вариабельная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов:

(i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211-50, 1970; Kabat et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991);

(ii) "гипервариабельные участки", HVR или HV, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям вариабельных доменов антитела, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *Mol. Biol* 196:901-17, 1987). Другие термины включают в себя "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) представлены 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).

Термины "каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой остаточные последовательности вариабельной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Так как антигенсвязывающие сайты, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркаса зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, а каркасы вариабельной области получены от последовательностей иммуноглобулинов человека. Гуманизированные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не являться точной копией экспрессированного иммуноглобулина человека или зародышевых генных последовательностей.

Термин "антитело человека" относится к антителу, имеющему вариабельные 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, если вариабельные области антитела получены из системы, в которой применяется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулинов. 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. Антитело человека может содержать аминокислотные отличия по сравнению с зародышевой линией человека или перестроенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, соматическими мутациями природного происхождения или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, антитело человека 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 зародышевой линии человека или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях антитело человека может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., *J Mol Biol* 296:57-86, 2000), или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, как описано, например, в 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 антитела человека.

Выделенные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Антитела человека, хотя и полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включая синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к получению антител, в естественных условиях не входящих в репертуар антител человека зародышевой линии *in vivo*.

Термин "рекомбинантное антитело" включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, например, антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческих иммуноглобулинов, или из полученной из него гибридомы (дополнительно описана 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 методами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* с помощью обмена плеч Fab.

Термин "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам. Следовательно, "моноклональным антителом" называется популяция антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование в пределах популяции антител. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, или моновалентным, бивалентным или мультивалентным.

Биспецифическое антитело включено в термин "моноклональное антитело".

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым 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 специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, формирующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-х мерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например заменами, вставками или делециями.

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

Термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие или распространение опухоли или опухолевых клеток. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые, и продление срока выживаемости по сравнению с ожидаемым сроком без получения лечения. Требующие лечения субъекты включают тех, которые уже имеют патологическое состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию патологического состояния или расстройства, или тех, у которых такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела 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, которые могут снижаться или ослабевать в связи с развитием резистентности, включают в себя, например, улучшение самочувствия пациента, сокращение опухолевой нагрузки, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие места в теле.

Термин "синергия", "синергизм" или "синергетический" означает эффект комбинации, превышаю-

щий ожидаемый аддитивный эффект.

Выражение "ингибирует рост" (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) относится к измеримому снижению роста клеток *in vitro* или *in vivo* при приведении их 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 посредством различных механизмов, например ADCC, апоптоза, некроза, или посредством ингибирования пролиферации клеток.

Термин "субъект" включает в себя любых людей или животных. Термин "животное" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д. Термины "субъект" и "пациент" в настоящем документе применяются взаимозаменяемо.

Термин "сурвивин" в настоящем документе относится к белку сурвивина, имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 22. Сурвивин является представителем семейства ингибиторов апоптоза (IAP). Сурвивин представляет собой белок с двойной функцией, выступая в качестве ингибитора апоптоза и регулятора клеточного цикла. Сверхэкспрессия сурвивина наблюдается при злокачественных новообразованиях у человека и положительно коррелирует с плохим прогнозом, рецидивом опухоли и устойчивостью к терапии (Liu et al., Cancer Biol. Ther., 7:1053-1060, 2008; Mita et al., Clin Cancer Res., 14:5000-5005, 2008).

SEQ ID NO: 22

mgaptlppawqpflkdhrstfknwplflegcactpermaeagfihcptenepdlaqcff

cfkelegwepdddpieehkhhsgcaflsvkkqfeeltlgeflkldrerknkiaketnnkkke

feetaekvrraieqlaamd

Термин «ингибитор сурвивина» обозначает молекулу, которая ингибирует, выступает в качестве антагониста, уменьшает или подавляет активность сурвивина; например, молекулу, которая ингибирует антиапоптозную активность сурвивина в клетке. Ингибитор сурвивина может ингибировать антиапоптозную активность сурвивина на около 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 100%. Ингибиторы сурвивина могут представлять собой малую молекулу, пептид, вакцину, полинуклеотид, молекулу ДНК или РНК.

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на полученных данных о том, что стромальные клетки костного мозга (BMSC), находящиеся в нише КМ, защищают клетки ММ от индуцированной антителами ADCC, по меньшей мере частично посредством повышающей регуляции сурвивина, и что ингибиторы сурвивина усиливают опосредованную антителами ADCC в отношении клеток ММ и устраняют устойчивость к ADCC, вызванную BMSC. Показано, что BMSC защищают клетки ММ от зависящего от цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) лизиса посредством иммунорезистентности, опосредованной клеточной адгезией, а также обнаружено, что экспрессия сурвивина увеличивается в резистентных к лизису клетках ММ (de Haart et al., Clin Cance Res 19:5591-5601, 2013).

В настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38 и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли.

В настоящем изобретении также предложен способ ингибирования роста или пролиферации клеток множественной миеломы у субъекта, включающий введение антитела к CD38 и ингибитора сурвивина требующему этого субъекту в течение времени, достаточного для ингибирования роста или пролиферации клеток множественной миеломы.

Термин "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, лимфоплазмоцитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома (МКЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), включая низкодифференцированную, умеренно дифференцированную и высокодифференцированную ФЛ, кожная лимфома из клеток центра фолликула, В-клеточная лимфома маргинальной зоны (типа MALT, узловая и селезеночная), волосатоклеточный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ), лимфома Беркитта (ЛБ), плазмодитома, множественная миелома (ММ), плазмодитарный лейкоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемия Вальденстрема, плазмодитарные 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 плазмоцитарный лейкоз. Была описана экспрессия CD38 на эпителиальных/эндотелиальных клетках различного происхождения, включая железистый эпителий простаты, островковые клетки поджелудочной железы, протоковый эпителий желез, включая околоушную железу, бронхиальные эпителиальные клетки, клетки яичек и яичников и эпителий опухоли колоректальной аденокарциномы. Другие заболевания, во время которых может наблюдаться экспрессия CD38, включают, например, бронхоэпителиальные карциномы легкого, рак молочной железы (развивающийся в результате злокачественной пролиферации эпителиальной выстилки в протоках и долях молочной железы), опухоли поджелудочной железы, развивающиеся из β -клеток (инсулиномы), опухоли, развивающиеся из эпителия в кишечнике (например, аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома), карцинома в предстательной железе и саркомы в яичках, а также раковые заболевания яичника. В центральной нервной системе CD38 экспрессируется нейробластомами.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ), мантийноклеточную лимфому (МКЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ММ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ОЛЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой НХЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ЛБ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ФЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой МКЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ОМЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ХЛЛ.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой болезнь плазмочитов.

В некоторых вариантах осуществления болезнь плазмочитов представляет собой амилоидоз легких цепей (АЛЦ), множественную миелому (ММ) или макроглобулинемию Вальденстрема.

В некоторых вариантах осуществления заболевание плазмочитов представляет собой АЛЦ.

В некоторых вариантах осуществления заболевание плазмочитов представляет собой ММ.

В некоторых вариантах осуществления заболевание плазмочитов представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема.

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

В одном варианте осуществления расстройство, затрагивающее CD38-экспрессирующие клетки, представляет собой лимфому Ходжкина.

Другие примеры расстройств, связанных с CD38-экспрессирующими клетками, включают в себя злокачественные заболевания 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, 78 энтеропатийную Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, подкожную панникулит-подобную Т-клеточную лимфому, бластную NK-клеточную лимфому, фунгоидную гранулему/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные

Т-клеточные лимфопролиферативные расстройства (первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома К-АККЛ, лимфоматоидный папулез, пограничные очаги), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, неспецифицированную периферическую 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 миелопролиферативные заболевания, включая хронический миелоидный лейкоз.

В способах изобретения могут быть использованы любые антитела к CD38. Вариабельные области антител к CD38 можно получать из существующих антител к CD38 и необязательно их клонировать как полноразмерные антитела с использованием стандартных способов. Примеры вариабельных областей антител, связывающих CD38, которые можно применять, описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 05/103083, WO 06/125640, WO 07/042309, WO 08/047242, WO 12/092612, WO 06/099875 и WO 11/154453A1.

Примером антитела к CD38, которое можно применять, является DARZALEXTM (даратумумаб). DARZALEXTM (даратумумаб) содержит аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), показанные в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3, показанные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3, показанные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и является подтипом IgG1/κ. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи DARZALEXTM (даратумумаба) показана в SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 1

mancefsvsgdkpccrlsrraqlclgvsilvlilvvvlavvvprwrqqwsgpgttrkf
 petvlarcvkyteihpemrhvdcqsvwdafkgafiskhpcniteedyqplmklgtqtpcnkil
 lwsrikdlahqftqvqrdmftledtllyladdltwcgefntskinyqscpdwrkdcsnnpvsv
 fwktvsrrfaeaacdvvhmlngsrskifdknstfgsvevhnlgpekvtleawvihgredsr
 dlcqdptikelesiiskrniqfscskniyrpdkflqcvknpedssctsei

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA
 ISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK
 ILWFGEFVFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
 ASNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ
 GTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEFVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEFVFDYWGQGLTVTVSSA
 STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 ARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Другим примером антитела к CD38, которое можно применять, является mAb003, содержащее по-
 следовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США №
 7829693.

SEQ ID NO: 14
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIAN
 SAQKFQGRVTITADKSTSTAY
 MDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPFDDYWGQGLTLTVTVSSAS
 SEQ ID NO: 15
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISWLAHYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQ
 EDFATYYCQYNSYPRTFGQGTKEIK

Другим примером антитела к CD38, которое можно применять, является mAb024, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно и описанное в патенте США № 7829693.

SEQ ID NO: 16
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKLEWMGIIPHDSDAR
 YSPSFQGVTFSDAKSISTAY
 LQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVTVSS
 SEQ ID NO: 17
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAHYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEP
 EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIK

Другим примером антитела к CD38, которое можно применять, является MOR-202 (MOR-03087), содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно и описанное в патенте США № 8088896.

SEQ ID NO: 18
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKLEWVSGISGDPSTNTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAWYWGQGLTLTVTVSS
 SEQ ID NO: 19
 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQQKPGQAPVLIYIGDSKRPSGIPE
 RFGSGNSGNTATLTISGTQAE
 DEADYYCQTYTGASLVFGGGTKLTVLGQ

Другим примером антитела к CD38, 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
 QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGT
 IYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGD
 YYGSNSLDYWGQTSVTVSS
 SEQ ID NO: 21
 DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRLIYS
 ASYRYIGVPRDFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGG
 GTKLEIK

Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут также быть выбраны de novo, например, из библиотеки фагового дисплея, где фаг конструируется таким образом, чтобы экспрессировать иммуноглобулины человека или их участки, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные переменные области антитела (Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000; Krebs et al., J Immunol Meth 254:67-84, 2001; Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets et al., PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks et al., J Mol Biol 222:581, 1991). Переменные домены, связывающие CD38, можно выделять, например, из библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих переменные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в Shi et al (2010) J. Mol. Biol. 397:385-96 и в международной публикации № WO 09/085462). Можно проводить скрининг библиотек антител в отношении связывания с внеклеточным доменом CD38 человека, дополнительно характеризовать полученные положительные клоны и из лизатов клонов выделять Fab и впоследствии клонировать в виде полноразмерных антител. Такое применение способов фагового дисплея для выделения антител человека принято в данной области. 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.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим VL с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта с множественной миеломой, включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения множественной миеломы.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта с множественной миеломой, включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения множественной миеломы.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую последовательность аминокислот, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

Антитело можно оценивать по их конкуренции с эталонным антителом, например DARZALEX™ (даратумумаб, имеющий VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в отношении связывания с CD38 с применением хорошо известных способов *in vitro*. В примере способа клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие CD38, могут инкубироваться с немеченым эталонным антителом в течение 15 мин при 4°C с последующим инкубированием с избытком флуоресцентно меченного исследуемого антитела в течение 45 мин при 4°C. После промывания в фосфатно-солевом буферном растворе с бычьим сывороточным альбумином (PBS/BSA) можно проводить измерение флуоресценции проточной цитометрией с помощью стандартных методов. В другом примере способа внеклеточный участок человеческого CD38 может быть нанесен на поверхность планшета для ELISA. В течение около 15 мин можно добавлять избыток немеченого эталонного антитела, а впоследствии можно добавлять биотинилированные исследуемые антитела. После промывок в PBS/Tween можно определять связывание исследуемого биотинилированного антитела с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и обнаруживать сигнал с помощью стандартных методов. Очевидно, что в конкурентных анализах эталонное антитело может быть меченым, а исследуемое антитело - немеченым. Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если эталонное антитело ингибирует связывание исследуемого антитела или исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100%. Можно дополнительно определять эпитоп исследуемого антитела, например, путем пептидного картирования или посредством анализов с защитой водорода/дейтерия с помощью известных методов, или же посредством определения структуры кристалла.

Антитело к CD38 связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), если антитело связывается, по меньшей мере, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 остатками в последовательности SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 связывает по меньшей мере одну аминокислоту в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одну аминокислоту в

области EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 связывает по меньшей мере две аминокислоты в области SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере две аминокислоты в области EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 связывает по меньшей мере три аминокислоты в области SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере три аминокислоты в области EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

Примером антитела, которое связывается с областью SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1) является DARZALEX™ (даратумумаб).

Антитела, связывающиеся с областью SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов и как описано в настоящем документе, и характеристики полученных антител по связыванию с пептидами, например, используя анализ ELISA или исследования мутагенеза.

Участок Fc антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), как более подробно описано ниже. 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. Изотипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 показывают различную способность к выполнению эффекторных функций. ADCC может быть опосредована IgG1 и IgG3, ADCP может быть опосредован IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а CDC может быть опосредована IgG1 и IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой изотип IgG2.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой изотип IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой изотип IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или апоптоза.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток путем ADCC.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток путем ADCP.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток путем CDC.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток путем апоптоза.

Термины "антителозависимая клеточная цитотоксичность", "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляют собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными киллерными клетками, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся 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 MM, происходит в результате активности эффекторных клеток через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки ADCC-активности антитела к CD38 данное 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. Цитоллиз может быть обнаружен по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков). Примеры эффекторных клеток для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. В качестве клеток-мишеней могут использоваться клеточные линии множественной миеломы или первичные клетки MM, которые экспрессируют CD38. В примере анализа клеточные линии MM, сконструированные с возможностью экспрессии люциферазы, инкубируют с антителами к CD38. Свежевыделенные эффекторные клетки PBMC добавляют с соотношением клеток-мишеней к эффекторным клеткам 40:1. Через 4 ч после добавления PBMC добавляют люциферин,

и полученный биолюминесцентный сигнал, излучаемый выжившими клетками ММ, определяли в течение 20 мин с помощью люминометра (SpectraMax, Molecular Devices), а процентную долю ADCC клеток ММ рассчитывали по формуле: $\% ADCC = 1 - (\text{средний биолюминесцентный сигнал в отсутствие РВМС} / \text{средний биолюминесцентный сигнал в присутствии РВМС}) \times 100\%$. Антитело к CD38 "индуцирует ADCC in vitro", если $\% ADCC$ в анализе in vitro, например таком, как описан выше, составляет по меньшей мере около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 или 100%.

Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc 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 осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует проявлению ADCC посредством связывания на лейкоцитах с рецепторами комплемента (например, CR3). В примере анализа первичные клетки ВМ-MNC, выделенные из организма пациента со злокачественной В-клеточной опухолью, можно обрабатывать в течение 1 ч антителом к CD38 и комплементом, полученным из 10% пула человеческой сыворотки, в концентрации 0,3-10 мкг/мл, а выживаемость первичных CD138+ клеток ММ можно определять проточной цитометрией, 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 настоящем документе. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать CDC на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз" (ADCP) относится к механизму удаления покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. ADCP может оцениваться с помощью моноцитарных макрофагов в качестве эффекторных клеток и клеток Дауди (ATCC® CCL-213™) или опухолевых клеток В-клеточного лейкоза или лимфомы, экспрессирующих CD38, в качестве клеток-мишеней, сконструированных с целью экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) или другой меченой молекулы. Соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 ч, с антителом к CD38 или без него. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, и можно определять процентное значение фагоцитоза на основании $\%$ флуоресцирующего GFP в макрофагах CD11+CD14+ с помощью стандартных методов. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать ADCP на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

ADCC, вызванную антителами к CD38, можно усиливать путем введения некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных положениях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует индексу EU), как описано в патенте США № 6737056.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD38 содержат аминокислотные замены в Fc антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD38 содержат замену в Fc антитела в аминокислотных положениях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует индексу EU).

ADCC, вызванную антителами к CD38, также можно усиливать посредством конструирования олигосахаридного компонента антитела. IgG1 или IgG3 человека подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах около по меньшей мере 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или активности CDC. Такие модифицированные антитела можно получать с помощью различных способов, которые по имеющимся данным приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64(2):249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs* 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение гибридной клеточной линии крысы YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (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., *Bio-technol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифу-нензина (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).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 имеет 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы 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 вариантах осуществления антитело к CD38 имеет 2-антенарную гликановую структуру 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 могут усиливать активность ADCC антитела к CD38.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут характеризоваться и количественно измеряться посредством множества 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); 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением посредством ВЭЖХ (СВЭЖХ) с обнаружением с помощью флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализом 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, сохраняя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщепления антитела 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); 5) отделения олигосахаридов антитела от белка антитела посредством специфического ферментативного дегликозилирования с помощью ПНГазы F в Asn 297. Высвобожденные таким образом олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методиками, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определять степень сialiлирования ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделять и количественно измерять формы олигосахаридов по критерию гидрофильности посредством ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделять и количественно измерять олигосахариды посредством высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Выражения "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы", используемые в заявке, относятся к антителам с содержанием фукозы от около 0 до около 15%.

"Нормальнофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы" в настоящем документе относится к антителам с содержанием фукозы приблизительно более 50%, как правило, приблизительно более 80 или более 85%.

Антитела, которые по существу идентичны антителу, содержащему тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13, могут использоваться в способах изобретения. Термин "по существу идентичный" в настоящем документе 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 настоящего изобретения можно применять в качестве искомой последовательности при осуществлении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, применяемых для выполнения таких поисков, являются программы XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Вестборо, штат Массачусетс, США) с применением настроек по умолчанию. Примеры замен, которые могут проводиться для антител к CD38, применяемых в способах изобретения, представляют собой, например, консервативные замены на аминокислоты, имеющие аналогичный заряд, гидрофобные свойства или стереохимические характеристики. Также могут осуществляться консервативные замены для улучшения свойств антитела, например стабильности или аффинности, или для улучшения эффекторных функций антитела. Можно осуществлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, например, в тяжелой или легкой цепи антитела к CD38. Более того, любой нативный остаток в тяжелой или легкой цепи также можно замещать аланином, как ранее было описано в отношении 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 определять желательные аминокислотные замены, когда такие замены необходимы. Аминокислотные замены могут быть осуществлены, 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 на варианты с желательными свойствами. Созданные варианты можно тестировать на их связывание с CD38 и их способность индуцировать ADCC с применением методов, описанных в настоящем документе.

Термин "консервативные модификации" означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают в себя замещения, добавления и делеции аминокислот. Консервативными замещениями являются такие, при которых аминокислота заменена остатком аминокислоты с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki et al., (1988) *Adv Biophys* 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах настоящего изобретения можно выполнять известными способами, например путем мутагенеза ПЦР (патент США № 4683195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, 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). Характеристики полученных вариантов антител могут быть исследованы с применением анализов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 может связываться с человеческим CD38 с различными аффинностями (KD). В одном варианте осуществления антитело к CD38 связывается с CD38 с KD, равной или меньшей чем около 1×10^{-8} M, например 5×10^{-9} M, 1×10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 1×10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 1×10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 1×10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 1×10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 1×10^{-14} M или 5×10^{-15} M, или в любом диапазоне или со значением, которое определяется методом поверхностного плазмонного резонанса или методом KineXa, которые используются специалистами в данной области. В примере значение аффинности равно 1×10^{-8} M или менее. В другом примере значение аффинности равно 1×10^{-9} M или менее.

Аппаратура KineXa, анализы методами ELISA или конкурентного связывания известны специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности взаимодействия конкретного антитела/CD38 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, KD, Kon, Koff), как правило, выполняются в стандартизированных условиях и с применением стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением оборудования Biorad 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в контексте KD характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для значения KD, равного 1×10^{-9} M, составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих антител к CD38 или области VL и VH, идентифицированные de novo, как описано в настоящем документе, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий CH3 в Fc антител с образованием биспецифических антител с помощью методик, 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.

Например, биспецифические антитела в соответствии с изобретением можно создавать in vitro в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области CH3 двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях для обеспечения изомеризации дисуль-

фидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое бивалентное антитело (например, антитело к CD38) и второе моноспецифическое бивалентное антитело конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене CH3, способствующие стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи; образуя таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубирования можно оптимально вернуть к невозстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозеритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

К примерам мутаций CH3, которые можно использовать в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифического антитела, относятся K409R и/или F405L.

Дополнительные биспецифические структуры, в которые могут быть встроены области VL и/или VH антител настоящего изобретения, могут представлять собой, например, иммуноглобулины с двойным переменным доменом (DVD) (международная патентная публикация № WO 2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например "лейциновую застежку-молнию" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO 2012/022811, патент США № 5932448; патент США № 6833441). DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; причем линкер является необязательным.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 конъюгировано с токсином. Способы конъюгации и приемлемые токсины хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления субъект с MM является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/F) или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/V). CD16 также известен как Fc-гамма рецептор IIIa (FcγRIIIa) или низкоаффинный рецептор к области Fc иммуноглобулина гамма, изоформа III-A. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в положении остатка 158 белка FcγRIIIa влияет на аффинность FcγRIIIa к IgG человека. Рецептор с полиморфизмами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V демонстрирует сниженное взаимодействие с Fc и, таким образом, сниженную ADCC по сравнению с FcγRIIIa-158V/V. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах человека повышает способность антител индуцировать ADCC вследствие улучшенного связывания антител с FcγRIIIa (CD16) человека (Shields et al., J Biol Chem 277: 26733-40, 2002). С помощью стандартных методов можно анализировать наличие у пациентов полиморфизма FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор сурвивина представляет собой малую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор сурвивина представляет собой полинуклеотид.

Ингибиторы сурвивина могут ингибировать индуцированный сурвином апоптоз посредством любого механизма, такого как ингибирование транскрипции гена или экспрессии белка сурвивина, ингибирование димеризации белка сурвивина, усиление дестабилизации или индуцирование его распада и т.п.

Примером ингибитора сурвивина, представляющего собой малую молекулу, является YM155. YM155 связывается с промотором сурвивина и ингибирует его транскрипцию. Другими примерами ингибиторов сурвивина, представляющих собой малые молекулы, являются, например, производные норгидрогваяретовой кислоты, описанные в патенте США № 6608108, и молекулы, описанные в патентной публикации США № US 2012/0122910. Другие полинуклеотидные ингибиторы сурвивина описаны, например, в патенте США № 6838283, международных патентных публикациях № WO 01/057059, № WO 09/114476 и № WO 09/044793. Полинуклеотидные ингибиторы включают в себя микроРНК (miRNA), малые интерферирующие РНК (siRNA), аллель-специфические олигонуклеотиды (ASO) и другие полинуклеотидные ингибиторы, известные в данной области.

Введение/фармацевтические композиции

В способах настоящего изобретения возможно предоставление антител к CD38 в приемлемых фармацевтических композициях, содержащих антитело к CD38 и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, эксципиент или несущую среду, с которыми вводят антитело к CD38. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например,

можно применять 0,4% солевой раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных 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, стабилизаторы, загустители, смазывающие агенты, красители и т.д. Концентрация молекул или антител изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем около 0,5%, обычно по меньшей мере до около 1% и до 15 или 20 мас.%, и будет преимущественно выбираться на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Способом введения антитела к CD38 в способах изобретения может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, ингаляционное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), или другие известные специалисту способы, хорошо известные в данной области.

Антитело к CD38 в способах настоящего изобретения можно вводить пациенту любым приемлемым путем, например парентерально посредством внутривенного (в/в) вливания или болюсной инъекции, внутримышечно или подкожно, или внутрибрюшинно. В/в вливание может осуществляться, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая пациенту с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 мг до около 100 мг/кг, например от около 0,05 мг 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 вводить фиксированную стандартную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на учете площади поверхности тела пациента, например 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения ММ обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно давать и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антитела к CD38 в способах настоящего изобретения 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 длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, антитело к CD38 в способах изобретения 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 внутривенного вливания.

Антитело к CD38 можно вводить в способах настоящего изобретения в виде поддерживающей терапии, например один раз в неделю в течение периода 6 или более месяцев.

Например, антитела к CD38 в способах изобретения 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 альтернативно 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 ч, или в любой их комбинации.

Антитело к CD38 в способах изобретения можно также вводить с профилактической целью, чтобы снизить риск развития рака, отложить начало проявления признаков прогрессирования рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака. Это может быть особенно полезно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

Антитело к CD38 в способах изобретения может быть лиофилизировано для хранения и восстановлено в соответствующем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

В способах настоящего изобретения антитело к CD38 вводят в комбинации с ингибитором сурвивина.

В способах настоящего изобретения антитело к CD38 вводят в комбинации с ингибитором сурвивина YM155.

YM155, применяемый в способах настоящего изобретения, можно легко получать в соответствии со способами продукции, описанными в международных патентных публикациях №№ WO 01/60803 и WO 2004/092160.

YM155 можно вводить перорально, парентерально или внутривенно. В этой связи инъекционный препарат для внутривенного введения включает в себя препараты, содержащие стерильные водные или неводные растворы, суспензии, эмульсии. Водный растворитель включает в себя, например, дистиллированную воду для инъекций и физиологический солевой раствор. Неводный раствор включает в себя, например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, спирты, такие как этанол, полисорбат 80 и т.п. Такие композиции могут дополнительно содержать регулирующие тоничность агенты, антисептики, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты и солюбилизующие агенты. Их можно стерилизовать, например, посредством фильтрации через бактериальный фильтр, добавления стерилизующих агентов или облучения. Альтернативно, можно получить стерильную твердую композицию и растворять или суспендировать ее в стерильной воде или стерильном растворителе для инъекций непосредственно перед применением.

При внутривенном введении YM155 можно вводить, например, в дозе 0,1-20 мг/м²/сутки, например 1-10 мг/м²/сутки, один раз в сутки или несколькими дозами, или непрерывно путем вливания (непрерывная инстиляция). YM155 можно вливать в дозе 3-10 мг/м²/сутки непрерывно в течение периода от 4 до 20 суток, например от 4 до 14 суток, или 5, 7, 10 или 14 суток, и/или в течение 7 суток. При дальнейшем продолжении введения лекарственное средство можно применять циклами, включающими период лекарственных каникул от 1 суток до 2 месяцев, от 7 до 21 суток или 14 суток после прерывания вышеуказанного периода введения лекарственного средства. Альтернативно, YM155 можно вводить непрерывно путем вливания в дозе 3-8 мг/м²/сутки в течение 7 суток с последующими лекарственными каникулами в течение 14 суток; данный цикл, в виде одного цикла, повторяют в зависимости от условий. Частота введения, доза, время вливания, цикличность введения лекарственного средства и т. п. могут быть правильно определены для каждого отдельного случая с учетом типа противоракового агента, состояния пациентов, возраста, пола и т.д.

В способах настоящего изобретения комбинацию антитела к CD38 и ингибитора сурвивина можно вводить в любом удобном временном интервале. Например, антитело к CD38 и ингибитор сурвивина можно вводить пациенту в одни и те же сутки. Однако антитело к CD38 и сурвивин также можно вводить в чередующиеся сутки или чередующиеся недели или месяцы и т.д. В некоторых способах антитело к CD38 и ингибитор сурвивина можно вводить достаточно близко во времени, чтобы они одновременно присутствовали на обнаруживаемых уровнях (например, в сыворотке) у получающего лечение пациента. В некоторых способах весь курс лечения антителом к CD38 состоит из введения нескольких доз в течение периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения ингибитором сурвивина, состоящий из нескольких доз. Можно использовать период восстановления, длящийся 1, 2 или несколько суток или неделю, между введением антитела к CD38 и ингибитора сурвивина.

Антитело к CD38 в комбинации с ингибитором сурвивина можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включая внешнее направленное излучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), а также любой формой радиохирургии, включая гамма-нож, кибер-нож, Linac и внутритканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GriaSite), и/или с хирургическим лечением.

Подкожное введение фармацевтических композиций, содержащих антитело, которое специфически связывается с CD38, и гиалуронидазу.

Антитело к CD38 можно вводить подкожно в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38, и гиалуронидазу.

Концентрация антитела к CD38 в фармацевтической композиции для подкожного введения может составлять около 20 мг/мл.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 1200 мг до около 1800 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 30000 Ед. до около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела к CD38 и около 30000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела

к CD38 и около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 30000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать гиалуронидазу gHuPH20 с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 23.

gHuPH20 представляет собой рекомбинантную гиалуронидазу (рекомбинантный HYLENEX®) и описана в международной патентной публикации № WO 2004/078140.

Гиалуронидаза представляет собой фермент, который разлагает гиалуроновую кислоту (ЕС 3.2.1.35) и снижает вязкость гиалуронана во внеклеточном матриксе, повышая таким образом проницаемость тканей.

SEQ ID NO: 23

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLIPCCLTNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEF
CLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYIDSITGVTNNGGIPQKISLQDH
LDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK
AKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWS
LWNESTALYPSIYLNTOQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF
LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQV
LCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSC
KEKADVKTDAVDVCIADGVCIADFLKPPMETEERQIFYNASPTLSATMFIVSILFLIISVA

Введение фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или дольше. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить один раз в неделю в течение восьми недель с последующим введением один раз в две недели в течение 16 недель с последующим введением один раз в четыре недели. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1200 мг антитела к CD38 и около 30000 Ед. гиалуронидазы, причем концентрация антитела, которое специфически связывает CD38, в фармацевтической композиции составляет около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1800 мг антитела к CD38 и около 45000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 30000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 45000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить подкожно в брюшную область.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить общим объемом около 80, 90, 100, 110 или 120 мл.

Для введения можно смешивать 20 мг/мл антитела к CD38 в растворе 25 mM ацетата натрия, 60 mM хлорида натрия, 140 mM D-маннита, 0,04% полисорбата-20, pH 5,5, с gHuPH20, 1,0 мг/мл (75-150 кЕд/мл) в растворе 10 mM L-гистидина, 130 mM NaCl, 10 mM L-метионина, 0,02% полисорбата-80, pH 6,5, перед введением смеси субъекту.

Дополнительные варианты осуществления изобретения

1. Антитело к CD38 для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с ингибитором сурвивина.

2. Ингибитор сурвивина для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с антителом к CD38.

3. Комбинация антитела к CD38 и ингибитора сурвивина для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль.

4. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с вариантом осуществления 2 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 3, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ), мантийноклеточную лимфому (МКЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

5. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1 или 4, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с вариантом осуществления 2 или 4, или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 3 или 4, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль.

венная опухоль представляет собой заболевание плазмочитов.

6. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 4 или 5, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с вариантом осуществления 2, 4 или 5, или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 3, 4 или 5, причем заболевание плазмочитов представляет собой амилоидоз легких цепей (АЛЦ), множественную миелому (ММ) или макроглобулинемию Вальденстрема.

7. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-6, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-6, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-6, причем заболевание плазмочитов представляет собой ММ.

8. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-7, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-7, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-7, причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-положительных клеток путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или апоптоза.

9. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-8, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-8, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-8, причем антитело к CD38 принадлежит:

- а) изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или
- б) изотипу IgG1.

10. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-9, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-9, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-9, причем антитело к CD38:

а) 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;

б) связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1);

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

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

е) содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно;

ф) содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 4, и аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи (VL), которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 5;

г) содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;

h) содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из:

- i) VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;
- ii) VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;
- iii) VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или
- iv) VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21; или

i. содержит:

- i) VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;
- ii) VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;
- iii) VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или
- iv) VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

11. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-10, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-10, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-10, причем антитело к CD38 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

12. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-11, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-11, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-11, причем ингибитор сурвивина представляет собой малую молекулу, полинуклеотид или вакцину.

13. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-

12, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-12, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-12, причем ингибитор сурвивина представляет собой YM155.

14. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-13, ингибитор сурвивина для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-13, или комбинация в соответствии с любым из вариантов осуществления 3 или 4-13, причем антитело к CD38 и ингибитор сурвивина вводят одновременно, последовательно или отдельно.

15. Антитело к CD38 для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с ингибитором сурвивина, причем антитело к CD38 содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11 соответственно;

16. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 15, причем антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

17. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 15 или 16, причем антитело к CD38 относится к изотипу IgG1.

18. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-17, причем антитело к CD38 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

19. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-18, причем антитело к CD38 и ингибитор сурвивина вводят одновременно, последовательно или отдельно.

20. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-19, причем антитело к CD38 вводят внутривенно.

21. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-19, причем антитело к CD38 вводят подкожно в фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу.

22. Антитело к CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 21, в котором гиалуронидаза представляет собой гHuPH20 с SEQ ID NO: 23.

23. Антитело к CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-22, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

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

Материалы и методы

Клетки и клеточная культура

Мононуклеарные клетки костного мозга (BM-MNC) и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC)

Аспираты КМ, полученные от пациентов с ММ или здоровых субъектов, а также периферическую кровь (ПК) здоровых субъектов, собирали с использованием протоколов и процедур, утвержденных институциональным комитетом по медицинской этике в соответствии с Хельсинкской декларацией. PBMC здорового донора (HD-PBMC) и BM-MNC выделяли посредством центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Нугауе из образцов ПК или аспиратов КМ соответственно. PBMC использовали непосредственно в качестве эффекторных клеток в экспериментах по ADCC; BM-MNC криоконсервировали до применения.

Клеточные линии множественной миеломы (MM)

Человеческие клеточные линии MM RPMI-8226 и UM9 с трансдуцированным геном люциферазы (Luc) поддерживали в среде RPMI1640 (Invitrogen), обогащенной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS; Integro BV) и антибиотиками (пенициллин/стрептомицин; Life Technologies) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

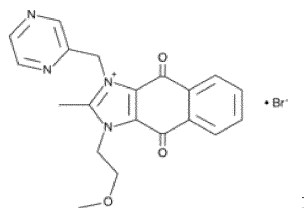
Стромальные клетки костного мозга (BMSC)

Выделяли и культивировали прикрепленные к субстрату BM-MNC здоровых субъектов (hBMSC) или пациентов с ММ (pBMSC) посредством адгезии к пластику. Клетки культивировали в среде Optimem (Invitrogen) с добавлением 5% лизата тромбоцитов, гепарина и антибиотиков. hBMSC использовали в экспериментах до шестого пересевания, а pBMSC использовали после одного или двух пересеваний.

Реагенты

YM155 (бромид сепантрония; 4,9-дигидро-1-(2-метоксиэтил)-2-метил-4,9-диоксо-3-(2-пиразинилметил)-1Н-нафт[2,3-д]имидазолия бромид; CAS 781661-94-7) (Selleck Chemicals) растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) в концентрации 1 мМ и разделяли на аликвоты для хранения до применения. YM155 разводили в среде для культивирования до концентраций, указанных в каждом эксперименте.

YM155; формула I:



Компартмент-специфические биоломинесцентные анализы антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) против клеточных линий множественной миеломы ("компаратмент-специфические анализы цитотоксичности на основе BLI")

hBMSC наносили с плотностью 1×10^4 клеток/лунку на белые непрозрачные 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar) в 100 мкл среды для культивирования. После завершения периода прикрепления продолжительностью шесть часов добавляли клеточные линии ММ с трансдуцированным геном luc с плотностью 1×10^4 клеток/лунку в лунки, покрытые или не покрытые BMSC. В экспериментах, в которых исследовали YM155, добавляли YM155 в указанных концентрациях вместе с клетками ММ. Через 16-20 ч добавляли даратумумаб в указанных концентрациях и оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Свежевыделенные PBMC здоровых субъектов впоследствии добавляли в качестве эффекторных клеток в указанных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней. Через 4 ч после добавления PBMC добавляли 125 мкг/мл люциферина жуков (Promega) и не позднее 20 мин с помощью люцинометра (SpectraMax, Molecular Devices) определяли биоломинесцентный сигнал, испускаемый выжившими клетками ММ. Процентную долю выживших клеток ММ рассчитывали по формуле: % выживаемости = (средний биоломинесцентный сигнал в отсутствие PBMC / средний биоломинесцентный сигнал в присутствии PBMC) $\times 100\%$. В этих анализах выживаемость клеток ММ напрямую отражает опосредованный ADCC лизис и коррелирует с классическими анализами с высвобождением хрома, описанными в публикации McMillin et al., Nat Med 16:483-489, 2010.

Анализ ADCC, основанный на сортировке клеток с активацией флуоресценции (FACS) в BM-MNC при множественной миеломе

В анализах ADCC, основанных на FACS, использовали замороженные BM-MNC пациентов с ММ, содержащие 15-35% CD138+ клеток ММ. Клетки размораживали и культивировали в 10%-м растворе лошадиной сыворотки (ЛС) в RPMI. Через 16-20 ч подсчитывали BM-MNC, исключая клетки, окрашенные трипановым синим, и наносили 4×10^4 клеток/лунку на 96-луночные круглодонные планшеты. Даратумумаб и/или YM155 добавляли в лунки согласно условиям эксперимента. Через 24 ч клетки окрашивали антителами к CD138, к CD38, к CD56 и к CD3, конъюгированными с флуоресцентными красителями, и определяли выживаемость первичных CD138+ клеток ММ в BM-MNC посредством FACS, как описано ранее (Groen et al., Blood 120:e9-e16, 2012). Процентное значение лизиса клеток ММ определяли с помощью следующей формулы: % лизиса клеток = $1 - (\text{число выживших CD138+ клеток в обработанных лунках} / \text{число из количества выживших CD138+ клеток в контрольных лунках}) \times 100\%$.

Проточная цитометрия

Для определения уровня экспрессии CD38 на клетках ММ указанные клетки ММ культивировали без BMSC или вместе с BMSC и инкубировали с антителами к CD38, конъюгированными с флуоресцеином. Клетки дополнительно окрашивали по CD105 в качестве маркера BMSC. Экспрессию CD38 на CD105-отрицательных клетках определяли посредством FACS, как описано (de Haart et al., Clin Cancer Res 19:5591-601, 2013).

Эксперименты in vivo по нацеленному воздействию на опухоль

Гибридные каркасы, состоящие из трех двухфазных частиц фосфата кальция размером 2-3 мм, покрытых HD-BMSC, загружали in vitro Luc+ клеточной линией ММ UM9 (1×10^6 клеток/каркас) перед п/к имплантацией мышам RAG2-/- γ c-/-, как описано ранее (Groen et al., Blood 120:e9-e16, 2012). Через десять дней после имплантации мышам с опухолями, растущими в каркасах, лечили контрольной несущей средой, даратумумабом+PBS или даратумумабом+YM155. Каждая из мышей, включая таковых из контрольной группы, дополнительно получала обедненные по Т-клеткам HD-PBMC (5×10^6 клеток) в качестве источника человеческих NK-клеток для индукции ADCC. PBS и YM155, разведенный в PBS, вводили с помощью инфузионных насосов для п/к вливания (Alzet 1007D), выполняющих непрерывную доставку 1 мг/кг/сутки лекарственного средства. Насосы извлекали через 10 суток. BLI выполняли, как описано ранее (Spraaren et al., Clin Cancer Res 16:5481-88, 2010; Rozemuller et al., Haematologica 93:1049-57, 2008).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) гранзима В

Содержание гранзима В (GzB) в бесклеточных супернатантах определяли с использованием коммерческого набора для ELISA (Pelipair, Sanquin, г. Амстердам, Нидерланды) согласно инструкции изготовителя.

Пример 1. Стромальные клетки костного мозга обеспечивают защиту клеток множественной миеломы от антителозависимой клеточной цитотоксичности

Так как стромальные клетки микро среды костного мозга (KM) защищают клетки MM от цитотоксичности, опосредованной CTL и NK-клетками, оценивали возникновение аналогичного защитного эффекта против антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), индуцированной даратумумабом.

Индукцию ADCC посредством BMSC здорового донора против двух CD38+ клеточных линий MM с трансдуцированным геном люциферазы (UM9 и RPMI) исследовали с использованием даратумумаба в нескольких последовательных концентрациях в присутствии или в отсутствие HD-PBMC в качестве эффекторных клеток в компартмент-специфических анализах цитотоксичности на основе BLI. В отсутствие BMSC даратумумаб опосредовал ADCC в обеих клеточных линиях MM дозозависимым образом. Обе клеточные линии были менее чувствительными к индуцированной даратумумабом ADCC в присутствии BMSC. На фиг. 1А показано влияние BMSC на индуцированную даратумумабом ADCC в клетках UM9, а на фиг. 1В показано влияние BMSC на индуцированную даратумумабом ADCC в клетках RPMI-8226.

Способность BMSC защищать первичные клетки MM от индуцированной даратумумабом ADCC также оценивали в анализе ADCC, основанном на FACS, с использованием описанной выше методологии. В указанных анализах BM-MNC, содержащие по меньшей мере 15% CD138+ положительных злокачественных плазмочитов и достаточные количества аутологичных эффекторных NK-клеток инкубировали с даратумумабом для индукции ADCC. BM-MNC исследовали либо сами по себе, либо при сокультивировании с аутологичными BMSC для оценки влияния BMSC. Анализ жизнеспособности на основе FACS выполняли через 24 часа культивирования для определения выживших CD138+ клеток и расчета лизиса. Индукция ADCC первичных клеток MM была менее эффективной в присутствии аутологичных MM-BMSC у обоих исследованных доноров (фиг. 2А и фиг. 2В), что указывает на индукцию стромальными клетками опухолевой микро среды резистентности к терапии даратумумабом.

Пример 2. BMSC-индуцированное подавление ADCC не вызвано понижающей регуляцией CD38 или супрессией NK-клеток.

Оценивали возможные изменения поверхностной экспрессии CD38 и активации NK-клеток, чтобы понять механизмы BMSC-опосредованной защиты от ADCC.

Клеточные линии MM UM9 и RPMI-8226 культивировали в присутствии или в отсутствие BMSC здорового донора.

Сокультивирование клеток MM с BMSC не приводило к снижению уровней экспрессии CD38 на какой-либо из клеточных линий MM (данные не показаны).

Так как известно, что BMSC продуцируют несколько иммуносупрессивных факторов, таких как IDO, TGF- β или PGE-2, защита от ADCC, обеспечиваемая BMSC, может быть связана с подавлением активации NK-клеток, что будет снижать их способность к дегрануляции и высвобождению гранзима В и перфорина в иммунных синапсах с целью уничтожения их мишеней. В связи с этим определяли влияние BMSC на активацию NK-клеток даратумумабом с использованием экскреции гранзима В, опосредованной даратумумабом, в качестве маркера NK-клеточной активации. Уровни гранзима В были по существу выше в супернатантах в присутствии pf BMSC (данные не показаны). Таким образом, BMSC-опосредованная защита от ADCC вероятнее всего не была связана с супрессией NK-клеток.

Пример 3. Ингибирование сурвивина устраняет BMSC-опосредованную защиту от ADCC и обеспечивает синергетическое ADCC-опосредованное уничтожение клеток множественной миеломы даратумумабом

Показано, что BMSC защищает клетки MM от лизиса CTL посредством повышающей регуляции сурвивина в клетках MM. Оценивали модуляцию сурвивина в качестве возможного механизма BMSC-опосредованной защиты от ADCC, индуцированной даратумумабом, с использованием ингибитора сурвивина YM155, представляющего собой малую молекулу.

Сначала оценивали влияние YM155 на жизнеспособность NK-клеток. BM-MNC пациентов с MM культивировали в присутствии различных доз YM155 в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток MM (CD138+ клетки) и NK-клеток (CD3-CD138-CD56+ клетки) определяли посредством FACS. YM155 не оказывал влияния на NK-клетки в дозах, которые уже продемонстрировали некоторую токсичность в отношении клеток MM (фиг. 3).

Влияние даратумумаба, YM155 или комбинации даратумумаба и YM155 оценивали в клетках RPMI-8226 и в двух образцах, полученных от пациентов с MM, с использованием концентраций YM155, которые, как было показано, не являются токсичными в отношении NK-клеток.

В анализах даратумумаб и YM155 использовали в концентрации 0,3 мкг/мл и 1 нМ соответственно для клеток RPMI-8226 и в концентрации 1 мкг/мл и 120 нМ для образцов, полученных от пациентов с MM соответственно. PBMC здорового донора использовали в качестве эффекторных клеток с соотношением эффекторных клеток и клеток-мишеней 40: 1 для клеток RPMI-8226 и 30: 1 для образцов, полученных от пациентов с MM.

В клетках RPMI-8226 даратумумаб в виде монотерапии или YM155 в виде монотерапии индуцировал лизис около 20% клеток в отсутствие BMSC. В присутствии BMSC даратумумаб индуцировал лизис около 10% клеток, а YM155 не оказывал никакого влияния. Комбинация даратумумаба и YM155 обеспе-

чивала синергетический эффект, вызвав лизис около 50% клеток в отсутствие BMSC и лизис около 45% клеток в присутствии BMSC (фиг. 4A). Синергетический эффект комбинации даратумумаба и YM155 в BMSC был приблизительно 5-кратным. Аналогично, комбинация даратумумаба и YM155 обеспечивала синергетический эффект в образце, полученном от пациента 1 с ММ, при использовании 120 нМ YM155 (фиг. 4B), умеренный синергетический эффект в образце, полученном от пациента 2 с ММ, при использовании меньшего количества YM155 (64 нМ) (фиг. 4C) и в объединенном образце клеток ММ, полученных от 4 пациентов (фиг. 4D). Следовательно, YM155 блокировал защитное действие BMSC на опосредованную даратумумабом ADCC в клетках и клеточных линиях ММ.

Таким образом, повышающая регуляция сурвивина может быть важным механизмом супрессии ADCC-опосредованного уничтожения клеток ММ, которую можно предотвращать путем фармакологической модуляции сурвивина.

Пример 4. Противоопухолевый эффект комбинированной терапии даратумумабом и YM155 *in vivo*

Значимость комбинации даратумумаба и YM155 *in vivo* исследовали в доклинической ксенотрансплантационной модели на мышах RAG2^{-/-}gc^{-/-}, у которых выращивали опухоли ММ в гуманизированной нише, схожей с КМ, созданной посредством подкожной имплантации керамических каркасов, покрытых человеческими BMSC. Гибридные каркасы, покрытые человеческими MSC и нагруженные клетками ММ линии UM9 с трансдуцированным геном люциферазы, имплантировали подкожно в спину мышей RAG2^{-/-}gc^{-/-} (4 каркаса на одну мышь). Через десять дней после имплантации растущие опухоли визуализировали и количественно оценивали посредством BLI. Впоследствии различные группы мышей (n=4) либо лечили контрольной несущей средой (контроль), либо лечили даратумумабом, YM155 или даратумумабом плюс YM155. YM155 или его несущую среду (PBS) доставляли с помощью подкожных инфузионных насосов со скоростью 1 мг/кг/сутки YM155 в течение 10 суток. Каждая мышь, включая контрольную группу, получала обедненные по Т-клеткам HD-PBMC (5×10⁶ клеток) в качестве источника человеческих NK-клеток для индукции ADCC. Мышей отслеживали еженедельно посредством BLI. На фиг. 5 показан относительный рост опухолей в каждой группе. Статистическую разницу между мышами, леченными даратумумабом, и мышами, леченными даратумумабом плюс YM155, рассчитывали, используя U-критерий Манна-Уитни. Даратумумаб оказывал незначительное влияние на рост опухоли. Эффект против ММ был более отчетливым при использовании YM155, который кроме того продемонстрировал сильный синергизм с даратумумабом, обеспечив значительное усиление эффектов против ММ. Эти результаты показали, что комбинация даратумумаба и ингибитора сурвивина YM155 может быть полезной с клинической точки зрения.

Представленные результаты демонстрируют, что подавление уровней сурвивина малой молекулой YM155 не только усиливало опосредованную даратумумабом ADCC в отсутствие BMSC, но, что не менее важно, предотвращало резистентность к ADCC, индуцированную BMSC.

Добавление YM155 к даратумумабу продемонстрировало повышенные противоопухолевые эффекты также в отсутствие BMSC, что указывает на потенциальную пользу комбинированной терапии YM155 и даратумумабом, даже если клетки ММ не находятся в прямом контакте с BMSC, как например при плазмоклеточном лейкозе. Более того, значительное усиление ADCC в виде увеличения лизиса клеток ММ до четырех раз в присутствии BMSC показывает, что при комбинировании терапии даратумумабом с YM155 может быть достигнута более большая польза в отношении клеток ММ, которые находятся в КМ. Также показано, что лечение YM155 не оказывает негативного влияния на функции или жизнеспособность NK-клеток, что является обязательным условием при рассмотрении возможности клинического применения данной комбинированной терапии.

Эффективность даратумумаба в комбинации с YM155 была продемонстрирована при множественной миеломе, однако, можно предположить, что указанная комбинированная терапия может оказывать положительное действие при других гематологических опухолях, которые экспрессируют CD38, в особенности тех, которые главным образом локализируются в КМ. В этом отношении очевидным кандидатом является ОМЛ, так как клетки ОМЛ экспрессируют высокие уровни не только CD38, но также сурвивина, который является прогностическим фактором плохих клинических результатов. Другим потенциальным кандидатом для комбинированной терапии может быть ХЛЛ, так как клетки ХЛЛ демонстрируют высокую экспрессию сурвивина в КМ, а у некоторых пациентов экспрессируется CD38. Высокая экспрессия CD38 и сурвивина в около 50% неходжкинских лимфом делает данное заболевание также пригодным для оценки эффективности комбинации YM155-даратумумаб. В целом, комбинация даратумумаба и YM155 может иметь широкое применение в большом диапазоне гематологических опухолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта с множественной миеломой (ММ), включающий введение требующему этого субъекту антитела к CD38 и ингибитора сурвивина в течение времени, достаточного для излечения ММ, где антитело к CD38 содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и

11 соответственно и где ингибитор сурвивина представляет собой бромид сепантрония (4,9-дигидро-1-(2-метоксиэтил)-2-метил-4,9-диоксо-3-(2-пиразинилметил)-1Н-нафт[2,3-d]имидазолия бромид; YM155).

2. Способ по п.1, в котором антитело к CD38 содержит вариательную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 4, и вариательную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность аминокислот, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 5.

3. Способ по п.2, в котором антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

4. Способ по п.3, в котором антитело к CD38 относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Способ по п.4, в котором антитело к CD38 относится к изотипу IgG1.

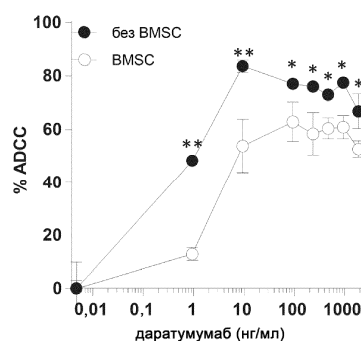
6. Способ по п.1, в котором антитело к CD38 и ингибитор сурвивина вводят одновременно, последовательно или раздельно.

7. Способ по п.6, в котором антитело к CD38 вводят внутривенно.

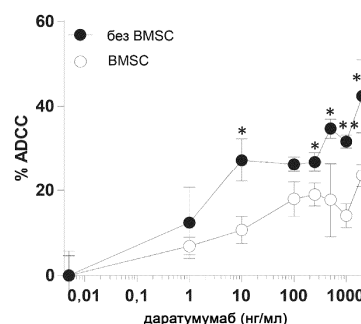
8. Способ по п.6, в котором антитело к CD38 вводят подкожно в фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу.

9. Способ по п.8, в котором гиалуронидаза представляет собой гHuPH20 с SEQ ID NO: 23.

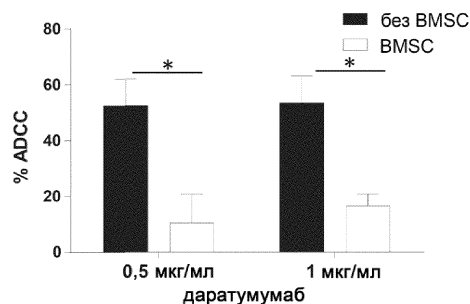
10. Способ по п.9, в котором антитело к CD38 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.



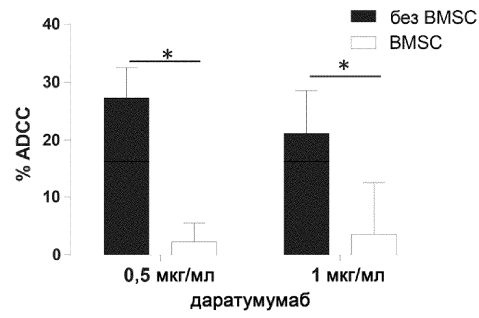
Фиг. 1А



Фиг. 1В

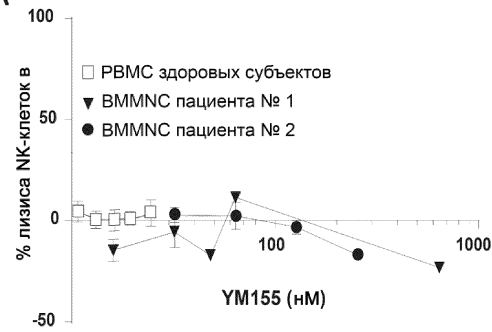


Фиг. 2А

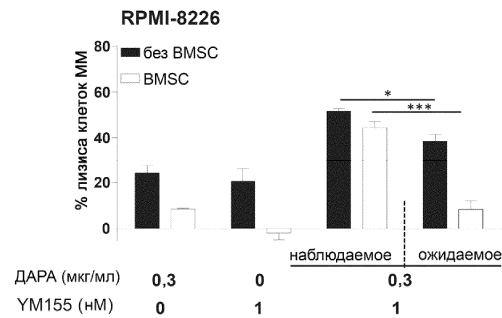


Фиг. 2В

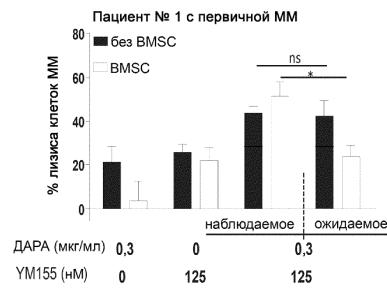
А



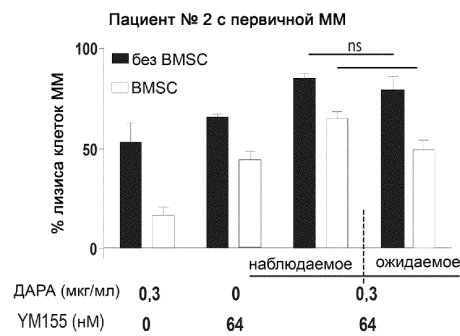
Фиг. 3



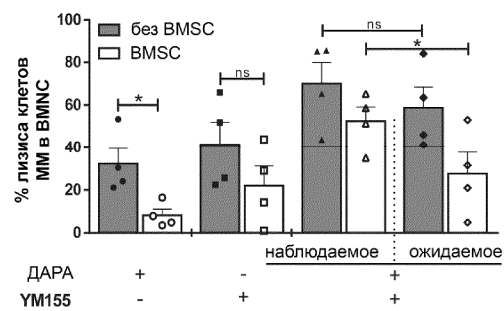
Фиг. 4А



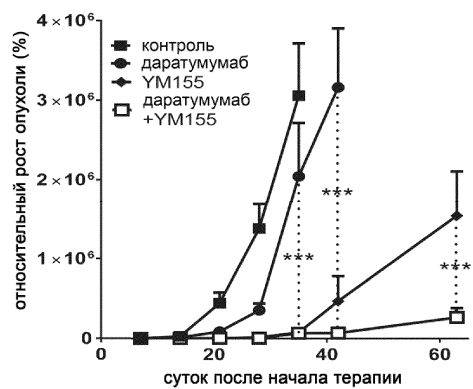
Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 4D



Фиг. 5

