

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037597**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.20

(21) Номер заявки
201691748

(22) Дата подачи заявки
2015.02.25

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА АНТИ-CD38 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

(31) **61/946,008; 62/004,540**

(32) **2014.02.28; 2014.05.29**

(33) **US**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/US2015/017425**

(87) **WO 2015/130732 2015.09.03**

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

(72) Изобретатель:
Доши Парул (US)

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

(56) **US-A1-20110099647**

WO-A2-2013059885

US-A1-20110293606

US-A1-20130323247

US-A1-20130137134

TABERNERO et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia*. 2001, vol. 15(3), p. 406-14. Entire documentation, especially Abstract; pg 406, col 1, lower para; pg 409, Table 1; and pg 412, col 1, para 1

ARICAN et al., Philadelphia chromosome (+) T-cell acute lymphoblastic leukaemia after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 1999, vol. 14(8), p. 2054-5. Entire documentation, especially pg 2054, col 1, para 1, and col 2, last para

US-A1-20100285004

SHIELDS et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001, vol. 276(9), p. 6591-604. Entire documentation, especially pg 6595, Table 1; pg 6597, col 2, middle para; and pg 6604, Ref. 18

US-B1-7183387

US-A1-20120201827

US-A1-20120259095

US-A1-20060257397

FLAVELL et al., Therapy of human T-cell acute lymphoblastic leukaemia with a combination of anti-CD7 and anti-CD38-SAPORIN immunotoxins is significantly better than therapy with each individual immunotoxin. *Br J Cancer*. 2001, vol. 84(4), p. 571-578. Entire documentation, especially Abstract

(57) Описание относится к вариантам комбинированной терапии с использованием антител анти-CD38. В частности, в описании приводятся способы лечения субъекта с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) с использованием антитела анти-CD38, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ in vitro посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 in vitro.

B1**037597****037597****B1**

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения острого лимфобластного лейкоза с использованием антител анти-CD38.

Предпосылки создания изобретения

CD38 представляет собой многофункциональный белок, функцией которого является опосредованная рецепторами адгезия и сигнализация, а также опосредование мобилизации кальция посредством своей эктоферментативной активности, катализирующей образование циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и АДФР. CD38 опосредует секрецию цитокинов, а также активацию и пролиферацию лимфоцитов (Funaro et al., J Immunol 145:2390-6, 1990; Terhorst et al., Cell 77:1-80, 1981; Guse et al., Nature 398:70-3, 1999). Благодаря своей НАД-гликогидролазной активности CD38 также регулирует уровни внеклеточного НАД⁺, который задействован в модуляции компартмента регуляторных Т-клеток (Adriouch et al., 14:1284-92, 2012; Chiarugi et al., Nature Reviews 12:741-52, 2012). В дополнение к сигнализации посредством Ca²⁺ сигнализация CD38 происходит за счет перекрестного обмена с комплексами антиген-рецептор на Т- и В-клетках или рецепторными комплексами других типов, например молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), с участием CD38 в нескольких клеточных ответах, а также при переключении и секреции IgG1.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа, который экспрессируется на гемопозитических клетках, таких как медуллярные тимоциты, активированные Т- и В-клетки, покоящиеся NK-клетки и моноциты, лимфобласты герминативного центра лимфатического узла, В-клетки плазмы, интрафолликулярные клетки и дендритные клетки. Часть нормальных клеток красного костного мозга, в частности клетки-предшественники, а также клетки пуповины являются CD38-положительными. Помимо лимфоидных клеток-предшественников CD38 экспрессируется на эритроцитах и на тромбоцитах, и экспрессия также наблюдается в некоторых солидных тканях, таких как кишечник, головной мозг, простата, кости и поджелудочная железа. Зрелые покоящиеся Т- и В-клетки экспрессируют ограниченные количества поверхностного CD38 или не экспрессируют его вовсе.

CD38 также 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 (LGL), лейкоз из NK-клеток и плазмоклеточный 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 яичников. В центральной нервной системе CD38 экспрессируется нейробластомами.

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) характеризуется нарушениями ранних стадий развития лимфатической системы и классифицируется как В-клеточный или Т-клеточный ОЛЛ. Лимфома Беркитта (лимфома зрелых В-клеток) также классифицируется как ОЛЛ. Заболеваемость ОЛЛ составляет около 6000 новых случаев в год или примерно 1 случай на 50000 человек. На ОЛЛ влияют генетические и экологические факторы, при этом было выявлено несколько хромосомных перестроек и субмикроскопических генетических изменений (Inaba et al., Lancet 381:1943-55, 2013). Частота общего ответа на лечение составляет около 80% у детей с ОЛЛ и около 45-60% у взрослых с ОЛЛ. К сожалению, для рецидивирующего ОЛЛ прогноз неблагоприятный.

Поэтому существует потребность в эффективных видах лечения ОЛЛ.

Изложение сущности изобретения

В одном варианте осуществления изобретения предлагается способ лечения субъекта с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана эффективность даратумаба в модели ОЛЛ из опухоли пациента (модель ALL 7015). На графике отложены значения среднее+стандартная ошибка среднего (SEM); значения

среднее+SEM отложены только для случаев, когда в исследовании в каждый момент времени (вначале было 10 мышей в каждой когorte) находилось 80% или более животных (по меньшей мере, 8 животных в каждой когorte). На оси Y показано процентное содержание опухолевой нагрузки, измеренное в виде % количества клеток CD45+ человека в результате деления на количество живых клеток.

На фиг. 2 показана эффективность даратумумаба в модели ОЛЛ из опухоли пациента (модель ALL 7043). На графике отложены значения среднее+SEM; значения среднее+SEM отложены только для случаев, когда в исследовании в каждый момент времени (вначале было 10 мышей в каждой когorte) находилось 80% или более животных (по меньшей мере, 8 животных в каждой когorte).

На фиг. 3 показана эффективность даратумумаба и даратумумаба в комбинации с винкристином для линии клеток ОЛЛ модели ксенотрансплантата опухоли (модель NALM-6). Животных разделяли на четыре группы лечения и вводили 10 мг/кг даратумумаба, 0,5 мг/кг винкристина или даратумумаб в комбинации с винкристином. На графике отложено значение медианного времени выживаемости в зависимости от количества суток после инокуляции опухоли.

Подробное описание изобретения

Термин "CD38" относится к белку CD38 человека (синонимы: АДФ - рибозилциклаза 1, цАДФр - гидролаза 1, циклическая АДФ - рибозогидролаза 1). Человеческий CD38 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1.

1) Предполагается, что термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включающие мышиные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

2) Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы 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).

3) Термин "фрагменты антитела" относится к части молекулы иммуноглобулинов, 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 - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, HV, CL и CH1; фрагмент F(ab)₂ - двухвалентный 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. (1989), Nature 341:544-546), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкциями антител, с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных публикациях РСТ №№ WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

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

5) Переменная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определяются с помощью различных терминов, таких как определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), и основаны на изменчивости последовательностей (Wu and Rabat, J Exp Med 132:211-50, 1970; Rabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), или "гиперпеременные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям переменных доменов антитела, которые являются гиперпеременными по структуре согласно определению Chothia and Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-17, 1987). Другие термины включают "IMGT-CDR" (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) и "использование остатков, определяющих специфичность" (SDRU)

(Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлена стандартизованная 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.

6) "Остатки по Chothia" в настоящем документе представляют собой остатки VL и VH антител с нумерацией по Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273:927-48, 1997).

"Каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой остаточные последовательности варибельной 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 от видов, отличных от человека, а каркасы варибельной области получены из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Гуманизированные антитела могут включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей.

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

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

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

Изолированные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Человеческие антитела, хотя и полученные из последовательностей человеческих иммуноглобулинов, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включающий 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 человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин "рекомбинантное антитело" в настоящем документе включает в себя все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или изолированные рекомбинантными способами, такие как антитела, изолированные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческих иммуноглобулинов, или полученные из его гибридомы (дополнительно описано ниже), антитела, изолированные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, изолированные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или изолированные любыми другими способами, которые охватывают сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* путем обмена плеч Fab, такие как биспецифические антитела.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе относится к препарату молекул анти-

тела 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.

Термин "эпитоп" в настоящем документе 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 конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

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

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

Термин "в комбинации с" в настоящем документе означает, что два или более терапевтических средства вместе можно вводить субъекту в смеси, 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, улучшение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. Нуждающиеся в лечении субъекты включают тех, которые уже имеют состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у которых состояние или расстройство необходимо предотвратить.

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 в соответствии с разнообразными механизмами, например посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза, некроза или ингибирования пролиферации клеток.

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

В одном варианте осуществления изобретения, описанном в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления предлагается способ лечения субъекта с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим варибельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и варибельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*.

В другом варианте осуществления изобретения, описанном в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления предлагается способ лечения субъекта с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого

CD38 (SEQ ID NO: 1), причем антитело анти-CD3 8 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ in vitro посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 in vitro. Эпитоп антитела включает некоторые или все из остатков, имеющих последовательности, показанные в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, эпитоп антитела содержит по меньшей мере одну аминокислоту в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одну аминокислоту в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, эпитоп антитела содержит по меньшей мере две аминокислоты в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере две аминокислоты в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, эпитоп антитела содержит по меньшей мере три аминокислоты в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере три аминокислоты в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, антитело анти-CD38 связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, KRN в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 14) в области EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

Примером антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1) или как минимум с остатками KRN и VQLT (SEQ ID NO: 14), как показано выше, является даратумумаб (см. международную патентную публикацию № WO 2006/0998647). Даратумумаб содержит аминокислотные последовательности VH и VL, показанные в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 и CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и является подтипом IgG1/κ. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи даратумумаба показана в SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 13.

```

SEQ ID NO: 1
MANCFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSLVLILVVLAVVPRWRQQWSGPGTTKRF
PETVLARCVKYTEIHPMRHVDQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKIL
LWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLAADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNPFVSV
FWKTVSRRAFAEACDQVHVMLNGSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSR
DLCQDPTIKELESII SKRNIQFSCCKNIYRDPKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2
SKRNIQFSCCKNIYR

SEQ ID NO: 3
EKVQTLAWVIHGG

SEQ ID NO: 4
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK
ILWFGEFVFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPPTFGQ
GTKVEIK

SEQ ID NO: 6
SFAMS

SEQ ID NO: 7
AISGSGGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 8
DKILWFGEFVFDY

SEQ ID NO: 9
RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10
DASNRAT

SEQ ID NO: 11
QQRSNWPPPTF

SEQ ID NO: 12
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEFVFDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCTCPPEPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

```

QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14

VQLT

Антитела можно оценивать по их конкуренции с даратумумабом, имеющим VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в отношении связывания CD38 с применением хорошо известных методов *in vitro*. В примере метода клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие CD38, могут инкубироваться с немеченым даратумумабом в течение 15 мин при 4°C с последующим инкубированием с избытком флуоресцентно-меченого тестового антитела в течение 45 мин при 4°C. После промывания в PBS/BSA можно проводить измерение флуоресценции проточной цитометрией с помощью стандартных методов. В другом примере метода внеклеточный участок человеческого CD38 может быть нанесен на поверхность планшета для ELISA. В течение около 15 мин может добавляться избыток немеченого даратумумаба, а впоследствии могут добавляться биотинилированные тестовые антитела. После промывок в PBS/Tween можно выявлять связывание тестового биотинилированного антитела с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и обнаруживать сигнал с помощью стандартных методов. Очевидно, что в конкурентных анализах даратумумаб может быть меченым, а тестовое антитело - немеченым. Тестовое антитело конкурирует с даратумумабом, если даратумумаб ингибирует связывание тестового антитела или тестовое антитело ингибирует связывание даратумумаба на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 100%. Можно дополнительно определить эпитоп тестового антитела, например, путем пептидного картирования или посредством анализов с защитой водорода/дейтерия с помощью известных методов или же посредством определения структуры кристалла.

Антитела, связывающиеся с одной и той же областью на CD38, такие как даратумумаб, могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов, а также как описано в настоящем документе. Дополнительная оценка антител может проводиться, например, путем анализа конкуренции между даратумумабом и тестовым антителом за связывание с CD38, как описано выше и с использованием хорошо известных методов *in vitro*.

Участок Fc антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Такая функция может быть опосредована связыванием эффекторного(-ых) домена(-ов) Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или связыванием эффекторного(-ых) домена(-ов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(-ы), опосредованный(-ые) Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводят к ингибированию и/или истощению популяции клеток-мишеней, например CD38-экспрессирующих клеток. Изогипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 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 описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления анти-CD38 индуцирует посредством ADCC уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 индуцирует посредством CDC уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 индуцирует посредством ADCP уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 индуцирует посредством апоптоза уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 индуцирует посредством ADCC и CDC уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

Без стремления к ограничению какой-либо конкретной теорией о механизме действия ожидается,

что антитело анти-CD38 изобретения будет индуцировать посредством ADCC, CDC, ADCP, апоптоза или модуляции *in vivo* ферментативной активности CD38 уничтожение *in vivo* клеток ОЛЛ, которые экспрессируют CD38.

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность", или "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность", или "ADCC" представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными клетками-киллерами, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством 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, происходит в результате активности эффекторных клеток через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки ADCC-активности антитела анти-CD38 антитело может добавляться к CD38-экспрессирующим клеткам в комбинации с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз, по существу, обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или естественных внутриклеточных белков). Примеры эффекторных клеток для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Примеры клеток-мишеней включают клетки Дауди (ATCC® CCL-213™) или клетки опухоли В-клеточного лейкоза или лимфомы, экспрессирующие CD38. В примере анализа клетки-мишени метят 20 мКи ⁵¹Сг в течение 2 ч и интенсивно промывают. Концентрацию клеток-мишеней могут корректировать до 1×10⁶ клеток/мл и в различных концентрациях добавлять антитела анти-CD38. Начинают проведение анализа путем добавления клеток Дауди в соотношении эффекторная клетка:клетка-мишень, равном 40:1. После инкубирования в течение 3 ч при 37°C проведение анализа прекращают путем центрифугирования, и на сцинтилляционном счетчике измеряют высвобождение ⁵¹Сг из лизированных клеток. Процентное значение клеточной цитотоксичности можно рассчитывать как % значение максимального лизирования, которое можно индуцировать путем добавления к клеткам-мишеням 3%-ной хлорной кислоты. Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать ADCC на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% контроля (лизис клеток индуцирован 3%-ной хлорной кислотой).

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз" (ADCP) относится к механизму уничтожения 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 эффекторная клетка:клетка-мишень может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки могут инкубироваться с клетками-мишенями в течение 4 ч, с антителом анти-CD38 или без него. После инкубации клетки можно отделить с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно провести с помощью антител анти-CD11b и анти-CD14, связанных с флуоресцентной меткой, и можно определить процентное значение фагоцитоза на основании % флуоресцирующего GFP в макрофагах CD11⁺CD14⁺ с помощью стандартных методов. Антитела анти-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%.

Термин "комплементзависимая 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 рецепторов комплемента (например, CR3). CDC для CD38-экспрессирующих клеток может измеряться, например, путем высевания клеток Дауди при 1×10⁵ клеток/лунку (50 мкл/лунку) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA), добавления 50 мкл антител анти-CD38 в лунки до конечной концентрации в диапазоне 0-100 мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37°C. Процентное количество (%) лизированных клеток может определяться как % окрашенных пропидий йодидом клеток при анализе FACS с помощью стандартных методов. Антитела анти-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%.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. Человеческие IgG1 или IgG3 являются N-гликозилированными по Asn297, как большинство гликанов в хорошо известных 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 Fc γ RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb 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* 64:249-65, 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 линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:34 66-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004) или коэкспрессия β -1, 4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II комплекса Гольджи или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008). ADCC, вызываемая антителами анти-CD38, которые применяются в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует EU-индексу), как описано в патенте США № 6737056.

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

В некоторых описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитела анти-CD38 содержат замену в Fc антитела в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует EU-индексу).

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

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

Замены в Fc и сниженное содержание фукозы может усиливать активность ADCC антитела анти-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 быть охарактеризованы и количественно измерены множеством методов, например 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/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) расщеплением mAb на составляющие пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС) или 5) отделением на Asn 297 олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования с помощью PNGase F. Высвобожденные 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 сиа-лирования 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).

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

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

Антитела анти-CD38, применяемые в способах, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, могут индуцировать уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ посредством апоптоза. Способы оценки апоптоза хорошо известны и включают, например, окрашивание аннексином IV с помощью стандартных методов. Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать апоптоз на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% клеток.

Антитела анти-CD38, применяемые в способах, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, могут индуцировать уничтожение *in vitro* клеток ОЛЛ посредством модуляции ферментативной активности CD38. CD38 представляет собой многофункциональный эктофермент с активностью АДФ-рибозилциклазы 1, катализирующей образование циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и АДФР из НАД⁺, также обладающий функцией гидролизовать НАД⁺ и цАДФР в АДФР. CD38 также катализирует обмен никотинамидной группы НАДФ⁺ на никотиновую кислоту в условиях кислой среды с получением НКАДФ⁺ (никотиновая кислота-аденидинуклеотидфосфат). Модуляцию ферментативной активности CD38 человека антителами анти-CD38, применяемыми в способах изобретения, можно измерять в анализе, описанном в публикации Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Например, субстрат НГД⁺ можно инкубировать с CD38, а модуляцию продукции циклической ГДФ-рибозы (цГДФР) можно отслеживать спектрофотометрически по возбуждению на длине волны 340 нм и испусканию на длине волны 410 нм в различные моменты времени после добавления антитела в различных концентрациях. Ингибирование синтеза цДЦФР можно определять в соответствии с методом ВЭЖХ, описанным в публикации Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000). Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, могут ингибировать ферментативную активность CD38 по меньшей мере на около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

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

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

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

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

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

Антитела, которые, 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. приме-

рами 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 анти-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 осуществить 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 анти-CD38. Более того, любой нативный остаток в тяжелой или легкой цепи также можно заменять на аланин, 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, их способность индуцировать ADCC, ADCP или апоптоз или модулировать ферментативную активность CD38 *in vitro* с применением методов, описанных в настоящем документе.

В описанных в настоящем документе способах и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 может связывать CD38 человека в диапазоне значений аффинности (K_D). В одном варианте осуществления в соответствии с изобретением и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 связывается с CD38 с высокой аффинностью, например со значением K_D , равным или составляющим менее чем приблизительно 10^{-7} М, таким как, без ограничений, 10^{-9} , 10^{-8} (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как 10^{-9} или 10^{-8}), 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} или любой входящий в него диапазон или значение, как определяется методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Кинеха, как практикуется специалистами в данной области. В одном примере значение аффинности равно 1×10^{-8} М или менее. В другом примере значение аффинности равно 1×10^{-9} М или менее.

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 конъюгировано с токсином. Способы конъюгации и приемлемые токсины хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления ОЛЛ представляет собой ОЛЛ В-клеточной линии.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления ОЛЛ представляет собой ОЛЛ Т-клеточной линии.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществ-

ления ОЛЛ представляет собой ОЛЛ у взрослых.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления ОЛЛ представляет собой ОЛЛ у детей.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 вводится для индуцирования ремиссии или в качестве постиндукционной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления ОЛЛ представляет рефрактерный или рецидивирующий ОЛЛ.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления у пациента регистрируется уровень лейкоцитов, составляющий по меньшей мере около 1×10^9 /л.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления клетки ОЛЛ содержат филадельфийскую хромосому.

Термин "филадельфийская хромосома", или "Ph-хромосома", относится к хорошо известной хромосомной транслокации между хромосомами 9 и 22, которая приводит к образованию онкогенного составного гена BCR-ABL с конститутивно активной тирозинкиназной активностью. Транслокация приводит к тому, что часть гена BCR хромосомы 22q11 сливается с частью гена ABL хромосомы 9q34, и результат обозначается как t(9;22)(q34;q11) в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры человека (ISCN). В зависимости от точного месторасположения слияния молекулярный вес получаемого составного белка может находиться в диапазоне от 185 до 210 кДа. Термин "филадельфийская хромосома" распространяется на все составные белки BCR-ABL, образованные в результате (9;22)(q34;q11) транслокации.

Ph-хромосома присутствует у около 20% взрослых с ОЛЛ и у небольшого процента детей с ОЛЛ, и она ассоциируется с неблагоприятным прогнозом. На момент рецидива пациенты с Ph+ положительным ОЛЛ могут получать схему лечения с ингибитором тирозинкиназы (TKI), а потому могут стать резистентными к TKI. Поэтому антитела анти-CD38 могут вводиться пациенту, который приобрел резистентность к селективным или частично селективным ингибиторам BCR-ABL. К примерам ингибиторов BCR-ABL относятся, например, иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, босутиниб, понатиниб, бафетиниб, саракатиниб, тозасертиб, данусертиб или ибрутиниб.

К другим хромосомным перестройкам, идентифицированным у пациентов с ОЛЛ В-клеточной линии, относятся t(v;11q23) (перестройка MLL), t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1 (E2A-PBX1), t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) и t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH.

В некоторых вариантах осуществления пациент страдает ОЛЛ с t(v;11q23) (перестройка MLL), t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1 (E2A-PBX1), t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) или t(5;14)(q31;q32); хромосомной перестройкой IL3-IGH.

Хромосомные перестройки можно идентифицировать с использованием хорошо известных методов, например флуоресцентной гибридизацией in situ, кариотипированием, гель-электрофорезом в пульсирующем поле или секвенированием.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления субъект является резистентным или приобрел резистентность к лечению по меньшей мере одним ингибитором BCR-ABL киназы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления по меньшей мере одним ингибитором BCR-ABL киназы является иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, босутиниб, понатиниб, бафетиниб, саракатиниб, тозасертиб, данусертиб или ибрутиниб.

Для определения того, является ли субъект резистентным, приобрел ли резистентность или является ли предрасположенным к развитию резистентности к лечению по меньшей мере одним ингибитором BCR-ABL киназы, можно использовать различные качественные и/или количественные методы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью, включают, например, ухудшение или отсутствие улучшения самочувствия пациента, увеличение размера опухоли, увеличение количества раковых клеток, прекращение или замедление торможения роста опухоли или опухолевых клеток и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных с опухолью, также может быть показателем того, что у субъекта развилась резистентность или он является предрасположенным к развитию резистентности по меньшей мере к одному ингибитору BCR-ABL киназы. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьировать в зависимости от типа ракового заболевания. Например, к симптомам, связанным с ОЛЛ, могут относиться увеличенные лимфатические узлы на шее, в паху или подмышках,

повышенная температура, потливость во сне, кашель, боль в груди, необъяснимая потеря веса, вздутие или боль в животе или ощущение наполненности. К другим средствам для определения того, развилась ли у субъекта резистентность по меньшей мере к одному ингибитору BCR-ABL киназы, относится анализ опухолевой нагрузки у пациента с ОЛЛ.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело анти-CD38 вводят в комбинации с винкристином.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления субъект получал или будет получать радиотерапию.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления субъекту получал или будет получать трансплант красного костного мозга.

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

В изобретении также предлагается способ лечения субъекта с ОЛЛ, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом субъект является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 CD16.

В изобретении также предлагается способ лечения субъекта с ОЛЛ, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом пациент является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 CD16.

Введение/фармацевтические композиции.

В способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитела анти-CD38 могут быть предложены в приемлемых фармацевтических композициях, содержащих антитело анти-CD38 и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, эксципиент или несущую среду, с которыми вводят антитело анти-CD38. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-ный солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и, по существу, не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т.д. Концентрация молекул или антител изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5 мас.%, обычно по меньшей мере от 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 носители и составы, включая другие человеческие белки, например сывороточный альбумин чело-

века, 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 анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, через легкие, через слизистые (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие известные специалисту способы, как хорошо известно в данной области.

Антитело анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может вводиться пациенту любым приемлемым путем, например парентерально посредством внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, или подкожно, или интраперитонеально. В/в инфузия может осуществляться в течение более, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая пациенту с ОЛЛ, является достаточной для ослабления или, по меньшей мере, частичного торможения заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 до около 100 мг/кг, например от около 0,05 до около 30 мг/кг, или от около 5 до около 25 мг/кг, или около 4, около 8, около 16 или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

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

Введение антитела анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления 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 анти-CD38 в способах изобретения может вводиться в дозе 8 или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель, с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Антитела анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления могут вводиться путем поддерживающей терапии, такой как, например, один раз в неделю в течение периода 6 месяцев или более.

Например, антитела анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления могут вводиться в виде суточной дозировки в количестве около 0,1-100 мг/кг, такой как 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 однократной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч или в любой их комбинации.

Антитела анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления могут также вводиться профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало распространения события в ходе 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 анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может быть лиофилизировано для хранения и перед применением может быть растворено в приемлемом носителе. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов, и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и растворения.

Антитело анти-CD38 в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может вводиться в комбинации с винкристином.

Винкрестин может вводиться в форме однократной и/п дозы, например от около 0,1 до 2 мг/кг, например однократной и/п дозы от 0,1 до 0,5 мг/кг, например 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 мг/кг. Винкрестин может вводиться в виде в/в инфузии.

В способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления комбинация антитела анти-CD38 и винкрестина может вводиться в любой удобный временной период. Например, антитело анти-CD38 и винкрестин можно вводить пациенту в одни и те же сутки и даже в одной и той же внутривенной инфузии. Однако антитело анти-CD38 и винкрестин можно также вводить в чередующиеся сутки или чередующиеся недели или месяцы и т.д. В некоторых способах антитело анти-CD38 и винкрестин можно вводить достаточно близко по времени, так что они одновременно присутствуют (например, в сыворотке) на обнаруживаемых уровнях у получающего лечение пациента. В некоторых способах весь курс лечения антителом анти-CD38 состоит из введения ряда доз в течение периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения винкрестином, который состоит из ряда доз. Можно применять период восстановления из 1, 2 или несколько суток или недель между введением антитела анти-CD38 и винкрестина.

Анти-CD38 антитело или комбинацию антитела анти-CD38 и винкрестина 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 GliSite), и/или с хирургическим лечением.

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

Дополнительные варианты осуществления изобретения.

Ниже изложены некоторые дополнительные варианты осуществления изобретения в соответствии с раскрытиями, представленными в других частях настоящего документа. Элементы из вариантов осуществления изобретения, изложенных выше, описанные как связанные с изобретением, раскрытым в настоящем документе, также относятся к каждому и любому из этих дополнительно пронумерованных вариантов осуществления.

1. Антитело анти-CD38 для использования при лечении субъекта с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

2. Антитело анти-CD38 для использования при лечении субъекта с ОЛЛ в комбинации с винкрестином.

3. Винкрестин для использования при лечении субъекта с ОЛЛ в комбинации с антителом анти-CD38.

4. 3. Комбинация антитела анти-CD38 и винкрестина для использования при лечении субъекта с ОЛЛ.

5. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, винкрестин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4, причем антитело анти-CD38 конкурирует за связывание 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.

6. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2 или 5, винкрестин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3 или 5 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4 или 5, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом антитело анти-CD38 предпочтительно индуцирует уничтожение клеток ОЛЛ *in vitro* посредством ADCC или CDC.

7. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5 или 6, винкрестин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5 или 6, или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-6, причем антитело анти-CD38 связывается с областью SKRNIQFSCKNLYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

8. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-7, винкрестин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-7 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-7, причем антитело анти-CD38:

- a) относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4;
- b) 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%; или
- c) содержит замену в Fc антитела в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 при нумерации остатков в соответствии с EU-индексом;

9. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-8, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-8 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-8, причем антитело анти-CD38 содержит:

- а) последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;
- б) последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;
- с) переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;
- д) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 13; или
- е) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

10. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-9, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-9 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-9, причем ОЛЛ представляет собой ОЛЛ В-клеточной линии, ОЛЛ Т-клеточной линии, ОЛЛ у взрослых, ОЛЛ у детей, рефрактерный ОЛЛ или рецидивирующий ОЛЛ.

11. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-10, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-10 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-10, причем антитело анти-CD38 вводится для индуцирования ремиссии или в качестве постиндукционной терапии.

12. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-11, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-11 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-11, причем у субъекта:

- а) регистрируется число лейкоцитов по меньшей мере около $1 \times 10^9/\text{л}$; или
- б) наблюдаются клетки ОЛЛ с филадельфийской хромосомой.

13. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-12, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-12 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-12, причем ингибитором BCR-ABL киназы является иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, босутиниб, понатиниб, бафетиниб, саракатиниб, тозасертиб, данусертиб или ибрути-ниб.

14. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-13, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-13 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-13, причем антитело анти-CD38 и винкристин вводятся одновременно, последовательно или отдельно.

15. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 2, 5-14, винкристин для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 5-14 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 4-14, причем:

- а) субъекту дополнительно проводится или проводилось лечение с помощью радиотерапии; или
- б) субъекту проводилась трансплантация гематopoэтических стволовых клеток.

Пример 1. Эффективность даратумумаба в модели ОЛЛ, полученной от пациента.

Методы.

В исследовании использовались модели опухоли пациента ALL 7015 и ALL 7473.

Модель ALL 7015. Проводили резекцию опухоли у женщины в возрасте 17 лет с ОЛЛ В-клеточной линии. Число лейкоцитов (WBC) составляло $98 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин (Hb) 101 г/л и число тромбоцитов (plt) равнялось $24 \times 10^9/\text{л}$. В клетках опухоли регистрировалась филадельфийская хромосома с перестройкой BCR/ABL-P210 (t(9;22)(q34;q11)). Клетки опухоли были отрицательными по следующим перестройкам: TEL/AML1, E2A/PBX1, родственный MLL ген, SIL/TAL1, IgH. Соотношение экспрессии гена опухоли Вильмса 1 (WT1) к гену ABL (WT1/ABL) составляло 1,2%. В костном мозге была очевидна гиперплазия I-й степени с 95% примитивных лимфоцитов. 92,8% аномальных клеток костного мозга экспрессировали CD38.

Модель ALL 7473. Проводили резекцию опухоли у мужчины в возрасте 35 лет с ОЛЛ Т-клеточной линии. WBC составляло $7,4 \times 10^9/\text{л}$, Hb 112 г/л, а plt $73 \times 10^9/\text{л}$. Клетки опухоли были отрицательными по следующей хромосомной перестройке: BCR/ABL. SIL/TAL, родственный MLL ген, TCR5. WT1/ABL составляло 2,0%. В костном мозге была очевидна гиперплазия I-II степени с 86% примитивных лимфоцитов. 78% аномальных клеток экспрессировали CD38.

Мышам NOD/SCID (самки, возраст 3-4 недели) инокулировали 2×10^6 замороженных клеток ALL-7015 или ALL-7473. Состояние животных оценивали каждые 3-4 суток на наличие клеток опухоли в периферической крови. Лечение начинали после того как опухолевая нагрузка в крови достигала определенного уровня (ALL 7015: 4,2% и ALL 7473: ~0,5%). Опухолевую нагрузку (ТВ) измеряли раз в неделю путем проточной цитометрии и определяли в виде процентного содержания клеток CD45⁺CD38⁺ в пери-

ферической крови, взятой при ретроорбитальном кровопускании. Ежедневно также отслеживалась заболеваемость и смертность животных. Случаи смерти и наблюдаемые клинические признаки регистрировались на основании количеств животных в каждой подгруппе.

Статистический анализ потенциальных терапевтических эффектов в промежутке между лечением проводили двухфакторным анализом ANOVA. Все данные со значениями $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

На фиг. 1 показана эффективность даратумумаба в модели ALL 7015, а на фиг. 2 показана эффективность даратумумаба в модели ALL 7473. В табл. 1 показана опухолевая нагрузка в различные моменты времени для модели ALL 7015. Лечение даратумумабом в дозе 10 мг/кг приводило к значительному ингибированию роста опухоли на сутки 29, 36 и 43 по сравнению с ростом опухоли у мышей, получавших изотипный контроль.

Таблица 1

Сутки	ALL-7015: опухолевая нагрузка (ТВ)				
	(% популяции клеток CD45 ⁺ человека)				Статистические результаты
	Изотип (10 мг/кг)		Даратумумаб (10 мг/кг)		Изотип по сравнению с даратумумабом (10 мг/кг)
	n	ТВ	n	ТВ	Значение P
D22 (создание групп)	10	4,4±0,3	10	4,6±0,5	$P > 0,05$
D29	10	33,4±1,5	10	19,7±2,5	$P < 0,01$
D36	10	53,3±4,5	10	19,8±3,4	$P < 0,001$
D43	10	80,7±2,5	10	53,6±3,4	$P < 0,001$

В табл. 2 приводится опухолевая нагрузка в различные моменты времени в модели ALL 7015. Лечение мышей даратумумабом показало значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с ростом опухоли у мышей, получавших контрольное антитело.

Таблица 2

Сутки	ALL-7473: опухолевая нагрузка (ТВ)				
	(% популяции клеток CD45 ⁺ человека)				Статистические результаты
	Изотип		Даратумумаб (10 мг/кг)		Изотип по сравнению с даратумумабом (10 мг/кг)
	n	ТВ	n	ТВ	Значение P
D22 (создание групп)	10	0,5±0,1	10	0,7±0,3	$P > 0,05$
D29	10	13,7±3,9	10	4,8±0,7	$P < 0,05$
D36	6	–	7	–	–
D43	1	–	1	–	–

Пример 2. Эффективность даратумумаба в модели В-клеточного ОЛЛ, полученной из клеточной линии.

Мышам CB17 SCID внутривенно через хвостовую вену инокулировали опухолевые клетки линии клеток NALM-6 в концентрации 1×10^5 в 100 мкл PBS для формирования опухоли. Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как сутки 0. Животных разделяли на четыре группы лечения и вводили даратумумаб, винкристин или даратумумаб в комбинации с винкристином в дозировках, описанных в табл. 3. Линия клеток NALM-6 (ACC128, DZMZ) была сформирована из периферической крови 10-летнего мальчика с ОЛЛ в рецидиве. Кариотип линии клеток 46(43-47)<2n>XY, t(5; 12)(q33.2; p13.2).

Таблица 3

Группы	n ^a	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь введения ^b	Схема ^c до завершения исследования
1	12	Носитель (IgG)	10	и/п	QW
2	12	Даратумумаб	10	и/п	QW
3	12	Винкристин	0,5	в/в	QW
4	12	Даратумумаб+ винкристин	10+0,5	и/п+в/в	QW+QW

n^a - количество животных;

и/п - интраперитонеальная инъекция;

в/в - внутривенная инъекция;

QW - введение один раз в неделю.

Конечная точка.

Основной конечной точкой была выживаемость животных. Каждую мышь ежедневно осматривали и с помощью CO₂ проводили эвтаназию мышей, у которых обнаруживали ухудшение или терминальное состояние (животные потеряли значительную массу тела: потеря веса составляла >20%), и животных, которые были не в состоянии потреблять достаточное количество пищи или воды. Отслеживали выживаемость животных, и для каждой группы рассчитывали медианное время выживаемости (MST). Значения веса тела определяли два раза в неделю. Выживших мышей умерщвляли по истечении максимум удвоенного медианного выживания в группе, получавшей носитель. Кроме того, после завершения наблюдения проводили вскрытие для подтверждения прогрессирования опухоли.

Результаты.

Лечение мышей одним лишь даратумумабом (в виде монотерапии) или в комбинации со стандартом лечения (винкристин) показало значительное пролонгирование выживаемости мышей по сравнению с мышами, получавшими контроль или один лишь винкристин (фиг. 3).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивида с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включающий введение индивиду анти-CD38 антитела, содержащего гипервариабельные области тяжелой цепи (HCDR): 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с последовательностями SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и гипервариабельные области легкой цепи (LCDR): 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с последовательностями SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с винкристином, где индивид является резистентным или приобрел резистентность к лечению ингибитором BCR-ABL киназы.

2. Способ по п.1, в котором анти-CD38 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

3. Способ по п.2, в котором анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

4. Способ по п.1, в котором ОЛЛ представляет собой ОЛЛ В-клеточной линии, ОЛЛ взрослых или ОЛЛ детей.

5. Способ по п.4, в котором ОЛЛ является рефрактерным или рецидивирующим ОЛЛ.

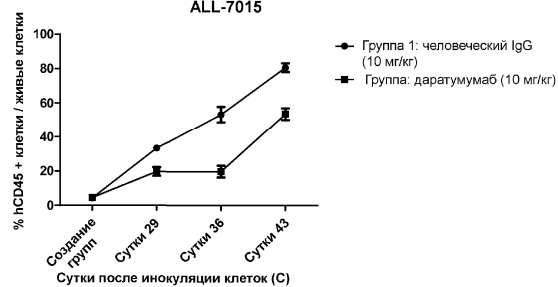
6. Способ по п.4, в котором анти-CD38 антитело вводят для индукции ремиссии или в качестве постиндукционной терапии.

7. Способ по п.1, в котором анти-CD38 антитело и винкристин вводят одновременно, последовательно или отдельно.

8. Способ по п.4, в котором пациент также получал или получает радиотерапию.

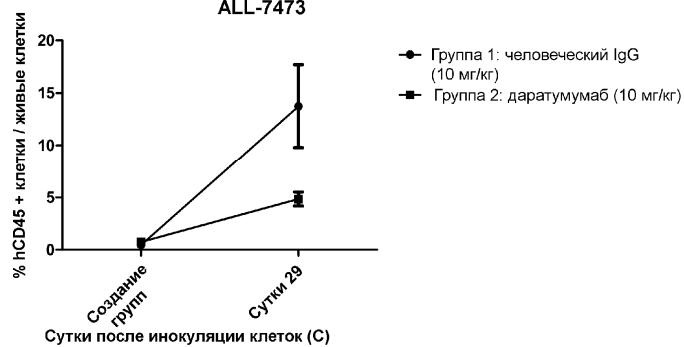
9. Способ по п.4, в котором пациенту проводили трансплантацию гематопозитических стволовых клеток.

Кривая роста опухолевой нагрузки после создания групп
ALL-7015

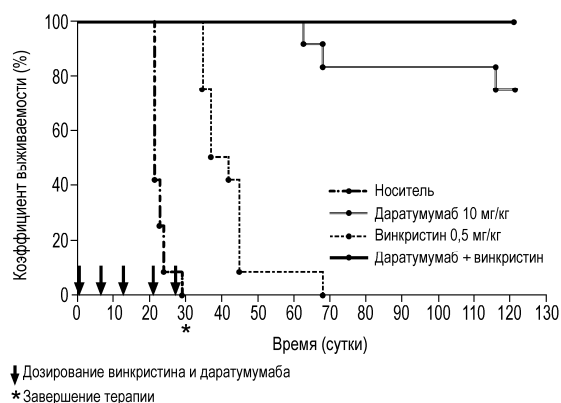


Фиг. 1

Кривая роста опухолевой нагрузки после создания групп
ALL-7473



Фиг. 2



Фиг. 3

