

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040870**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.09**

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201691747**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.02.25**

---

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

---

(31) **61/946,002; 62/006,386**

(56) US-A1-20090076249  
US-A1-20130109593  
US-A1-20120231008  
US-A1-20110300157  
US-A1-20070148178  
WO-A2-2008150530  
EP-A2-2567976

(32) **2014.02.28; 2014.06.02**

(33) **US**

(43) **2017.05.31**

(86) **PCT/US2015/017420**

(87) **WO 2015/130728 2015.09.03**

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

(72) Изобретатель:  
**Доши Парул (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,  
Соколов Р.А. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к медицине. Настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (CHOP), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*. Изобретение позволяет эффективно лечить неходжкинскую лимфому (НХЛ) и В-клеточные злокачественные заболевания.

---

**B1**

**040870**

**040870**

**B1**

### Область применения изобретения

Изобретение относится к вариантам комбинированной терапии с антителами анти-CD38.

#### Предпосылки создания изобретения

CD38 представляет собой многофункциональный белок, функцией которого является опосредованная рецепторами адгезия и сигнализация, а также опосредование мобилизации кальция за счет своей эктоферментативной активности, катализ образования 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 771-80, 1981; Guse et al., Nature 398:70-3, 1999). Благодаря своей НАД-гликогидролазной активности CD38 также регулирует уровни внеклеточного НАД<sup>+</sup>, который задействован в модуляции компартмента регуляторных Т-клеток (Adriouch et al., 14:1284-92, 2012; Chiaugi et al., Nature Reviews 12:741-52, 2012). В дополнение к сигнализации посредством Ca<sup>2+</sup> 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 транс-мембранный гликопротеин II типа, который экспрессируется на гемопозитических клетках, таких как медуллярные тимоциты, активированные Т- и В-клетки, покоящиеся НК-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, 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 НК-клеток и плазмноклеточный лейкоз. Была описана экспрессия CD38 на эпителиальных/эндотелиальных клетках различного происхождения, включая железистый эпителий в простате, островковые клетки в поджелудочной железе, протоковый эпителий в железах, включая околоушную железу, бронхиальные эпителиальные клетки, клетки яичек и яичников и эпителий опухоли в колоректальной аденокарциноме. Другие заболевания, во время которых может наблюдаться экспрессия CD38, включают в себя, 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 семиномы в яичках, а также раковые заболевания яичников. В центральной нервной системе CD38 экспрессируется нейробластомами.

Злокачественные В-клеточные заболевания могут возникать во всех лимфоидных тканях, в которых обычно продуцируются В-клетки. Большинству пациентов со злокачественными В-клеточными заболеваниями сначала был поставлен диагноз заболевания, затрагивающего красный костный мозг или лимфатические узлы. В случае поражения красного костного мозга трансформированные В-клетки зачастую циркулируют в крови и повсеместно распространяются по всем периферическим лимфоидным тканям. Однако злокачественные В-клеточные заболевания могут также развиваться в некоторых нелимфоидных тканях, таких как щитовидная железа, желудочно-кишечный тракт, слюнные железы и конъюнктивы.

Хорошо известные злокачественные В-клеточные заболевания включают в себя хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, мантийноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, лимфому Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, первичную выпотную лимфому и связанную со СПИД неходжкинскую лимфому (НХЛ). На долю злокачественных В-клеточных заболеваний приходится более чем 85% диагностированных лимфом.

НХЛ представляет собой широкий класс лимфом, развивающихся из лимфатической системы в результате злокачественной трансформации лимфоцитов (В-клеток или Т-клеток) и их неконтролируемой пролиферации с образованием опухолевой массы. Всего к НХЛ относится около 30 разных подтипов лимфомы с диапазоном фенотипов и прогнозов. По прогнозам, к 2019 году частота НХЛ в крупных странах рынка составит более 140000 случаев.

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL) представляет собой агрессивный и наиболее распространенный подтип НХЛ, на ее долю приходится 30-40% лимфоидных злокачественных заболеваний. К ней относится биологически и клинически разнообразный набор заболеваний. Исследования по

составлению профилей экспрессии генов показывают, что DLBCL можно разделить на две группы по профилям экспрессии генов. Эти группы известны как лимфомы из клеток, подобных В-клеткам герминативного центра (GCB), и лимфомы из клеток, подобных активированным В-клеткам (ABC).

Медицинский стандарт лечения DLBCL обычно называется CHOP - комбинация циклофосфамида, гидроксиданорубицина (доксорубин), винкристина и преднизона, или R-CHOP - комбинация антитела анти-CD20 ритуксимаба и CHOP. Кроме того, после ремиссии можно рассмотреть возможность трансплантации гематопоэтических стволовых клеток.

Несмотря на существующие варианты лечения, выживаемость в группах с высоким риском с агрессивной НХЛ может составлять лишь 30% в течение 5 лет. Таким образом, существует потребность в эффективных способах лечения и комбинированных способах лечения НХЛ и злокачественных В-клеточных заболеваний.

### **Изложение сущности изобретения**

Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (CHOP), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38.

### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1А представлена эффективность даратумумаба в модели полученной от пациента диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL) отдельно или в комбинации с CHOP или R-CHOP. Опухоли DLBCL после резекции имплантировали мышам SCID/Beige. Лечение начинали, когда размеры опухолей достигали приблизительно 125-250 мм<sup>3</sup>. Даратумумаб вводили в дозе 20 мг/кг один раз в неделю в течение трех недель. CHOP и R-CHOP вводили один раз в сутки 0, а преднизон вводили в сутки 0-4 по следующим схемам: CHOP: (циклофосфамид (CTX): 30 мг/кг в/в; доксорубин: 2,5 мг/кг в/в; винкристин: 0,4 мг/кг в/в); преднизон: 0,15 мг/кг п/о; R-CHOP: ритуксимаб 20 мг/кг и/п. СУТКИ 0. Объем опухоли измеряли каждые три дня. Ось Y представляет собой объем опухоли+стандартная ошибка среднего.

На фиг. 1В представлено медианное время выживания, отложенное в зависимости от числа суток после инокуляции опухоли в исследовании на фиг. 1А.

На фиг. 2 представлена эффективность даратумумаба в доклинической модели неходжкинской лимфомы отдельно или в комбинации с CHOP. 2×10<sup>5</sup> клеток Намальвы в Matrigel имплантировали мышам NOD SCID и лечение начинали, когда размер основной опухоли достигал приблизительно 189 мм<sup>3</sup>. Даратумумаб вводили в дозе 10 мг/кг один раз в неделю в течение трех недель. CHOP вводили ежедневно в сутки 0-5, применяя следующие дозы: циклофосфамид (CTX): 5 мг/кг в/в; доксорубин: 0,5 мг/кг в/в; винкристин: 0,08 мг/кг в/в; преднизон: 0,03 мг/кг п/о. Объем опухоли измеряли каждые три дня. Ось Y представляет собой объем опухоли+стандартная ошибка среднего.

На фиг. 3 представлена эффективность даратумумаба в доклинической модели DLBCL отдельно или в комбинации с CHOP. 5×10<sup>6</sup> клеток SU-DHL-6 имплантировали мышам NOD SCID, и лечение начинали, когда размер основной опухоли достигал приблизительно 154 мм<sup>3</sup>. Даратумумаб вводили в дозе 10 мг/кг один раз в неделю в течение четырех недель. CHOP вводили ежедневно в сутки 0-5, применяя следующие дозы: циклофосфамид (CTX): 5 мг/кг в/в; доксорубин: 0,5 мг/кг в/в; винкристин: 0,08 мг/кг в/в; преднизон: 0,03 мг/кг п/о. Размер опухоли отложен в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.

На фиг. 4 представлена эффективность даратумумаба в модели полученной от пациента диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL) в комбинации с CHOP или R-CHOP при введении одновременно или последовательно до дня 45 исследования. Даратумумаб вводили в дозе 20 мг/кг один раз в неделю в течение трех недель в сутки 0 или в сутки 7. CHOP вводили однократно в сутки 0, а преднизон вводили в сутки 0-4 по следующим схемам: CHOP: (циклофосфамид (CTX): 30 мг/кг в/в; доксорубин: 2,5 мг/кг в/в; винкристин: 0,4 мг/кг в/в); преднизон: 0,15 мг/кг п/о. Ритуксимаб вводили в дозе 20 мг/кг и/п либо в сутки 0, либо в сутки 7. Размер опухоли отложен в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. CNTO3930: контроль изотипа. Значения в скобках указывают на сутки введения дозы. Данные представляют результаты текущего исследования на сутки 44.

На фиг. 5 представлена эффективность даратумумаба в модели полученной от пациента DLBCL в комбинации с CHOP или R-CHOP при введении одновременно или последовательно до дня 101 исследования. Введение дозы осуществляли так же, как и на фиг. 4. Размер опухоли отложен в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. CNTO3930: контроль изотипа. Значения в скобках указывают на сутки введения дозы. Статистические различия в объеме опухолей определяли по двустороннему однофакторному анализу ANOVA с последующим использованием критерия множественного сравнения Даннета для сравнения групп, получавших лечение одним средством, с контролем и комбинациями со стандартным средством. \*P < 0,05 по сравнению с контролем, †P < 0,05 по сравнению с CHOP, циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном; DLBCL - диффузная В-крупноклеточная лимфома;

ИГХ - иммуногистохимия; в/в - внутривенно; и/п интраперитонеально.

### Подробное описание изобретения

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

Предполагается, что термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышинные, 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 классифицируются на изоформы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и ламбда (λ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "фрагменты антитела" относится к участку молекулы иммуноглобулина, который сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, например 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 в себя фрагмент Fab - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, HV, CL и CHI; фрагмент F(ab)<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CHI; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмент домена антитела (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы методами инженерии и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конструкций 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 одновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

Словосочетание "изолированное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, по существу не содержащему других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (например, антитело, которое специфически связывает 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.

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 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), или "гипервариабельные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относящиеся к областям переменных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре, согласно определению Chothia and 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 базе данных International ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www\\_imgt\\_org](http://www.imgt.org)) представлена стандартизованная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между границами CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

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

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

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.

Термины "адаптированные для человека" антитела или "адаптированные для человеческого каркаса" (HFA) антитела относятся к гуманизированным антителам, адаптированным по способам, описанным в патентной публикации США № US 2009/0118127. Адаптированные для человека антитела гуманизируют путем выбора человеческих каркасов-реципиентов на основе максимальных сходств CDR и FR, совместимости длины и сходства последовательностей петель CDR1 и CDR2 и участка 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 цепей, которые получены из последовательностей человеческого происхождения, где варибельные области антитела получены из системы, в которой применяется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перераспределенные гены иммуноглобулина. Такие системы включают в себя библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаге и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши, несущих локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. Человеческое антитело может содержать аминокислотные отличия по сравнению с человеческой зародышевой линией или перераспределенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, человеческое антитело, по 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 перераспределенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

Изолированные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Человеческие антитела, хотя и полученные из последовательностей человеческого иммуноглобулина, 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 антитела, что приведет 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 средствами, такие как антитела, изолированные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или из полученной из него 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 средствами, которые включают в себя сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина 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 антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания с двумя отдельными эпитопами.

Термин "эпитоп" в настоящем документе означает участок антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (например, полярных, неполярных или гидрофобных) поверхностных группировок остатков, например боковых цепей 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 трехмер-

ном 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 качестве отдельных средств или последовательно в качестве отдельных средств 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, например развития или распространения опухоли или опухолевых клеток. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение заболевания и ремиссию (полную или частичную), как обнаружимые, так и не обнаружимые. "Лечение" может также означать продление срока жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. Нуждающиеся в лечении субъекты включают в себя 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.

Словосочетание "ингибирует рост" (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) относится к измеримому снижению роста клеток *in vitro* или *in vivo* при приведении в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических или лекарственных средств по сравнению с ростом тех же клеток, растущих в соответствующих контрольных условиях, хорошо известных специалистам в данной области. Ингибирование роста клетки *in vitro* или *in vivo* может составлять по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Ингибирование роста клеток может происходить в соответствии с разнообразными механизмами, например за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза, некроза или ингибирования пролиферации клеток. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние при заболевании, возраст, пол и вес субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать желаемый ответ у субъекта. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

В изобретении предложены способы лечения пациентов, имеющих CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль. Изобретение основано на открытии синергетически высокой терапевтической эффективности антитела анти-CD38, вводимого в комбинации с CHOP или R-CHOP, *in vivo* в соответствующих моделях опухоли гематологической злокачественной опухоли.

Один вариант осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (CHOP), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение *in vitro* CD38-экспрессирующих клеток за счет ADCC или CDC.

Термин "CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль" относится к гематологической злокачественной опухоли, которая характеризуется наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, включая лейкозы, лимфомы и миелому. К примерам таких CD38-положительных гематологических злокачественных заболеваний относятся В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома клеток-предшественников и В-клеточная неходжкинская лимфома; острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и новообразования зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома (MCL), фолликулярная лимфома (ФЛ), включая высокодифференцированную, умеренно

дифференцированную и низкодифференцированную ФЛ, кожная лимфома из клеток центра фолликула, В-клеточная лимфома маргинальной зоны (типа MALT, узловая и селезеночная), лейкоз ворсистых клеток, диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), лимфома Беркитта (BL), плазмцитомы, множественная миелома, плазмноклеточный лейкоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемия Вальденстрема, плазмноклеточные лейкозы и анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому.

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому (ФЛ).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому Беркитта (BL).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой мантийноклеточную лимфому (MCL).

В одном варианте осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (BL), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (MCL).

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

В одном варианте осуществления изобретения, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, расстройство, связанное с клетками, экспрессирующими CD38, 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 С-ALCL, лимфоматоидный папулез, пограничные очаги), ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому, неспецифическую Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому.

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

В раскрытых в настоящем документе способах, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, может применяться любое антитело анти-CD38, при условии что антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38. Вариабельные области антител анти-CD38 можно получить из существующих антител анти-CD38 и клонировать как антитела с полной длиной с использованием стандартных способов. Примеры вариабельных областей, 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 11/154453 A1.

Примером антитела анти-CD38, которое можно применять, является даратумумаб. Даратумумаб содержит аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), которые показаны в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно 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

MANCEFSPVSGDKPCCLRSRRAQLCLGVSILVLIILVVVLAVVVRWRQQWSGPGTTKRF  
 PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKIL  
 LWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDRKDCSNNPVS  
 FWKTVSRRFAEAACDVHVMLNGSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLLEAWVIHGGREDSR  
 DLCQDPTIKELESIISKRNIFQFCKNIYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIFQFCKNIYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLLEAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA  
 ISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK  
 ILWFGPEPVFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  
 ASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ  
 GTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYADSVK

SEQ ID NO: 8

DKILWFGPEPVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLESGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILWFGEVFDYWGQGLVTVSSA  
 STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQ  
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP  
 ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Другим примером антитела анти-CD38, которое можно применять, является mAb003, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США № 7,829,693.

SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIFPLGIAN  
 SAQKFQGRVTITADKSTSTAY

MDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPFDFYWGQGLVTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQF

EDFATYYCQYNSYPRTFGQGTKVEIK

Другим примером антитела анти-CD38, которое можно применять, является mAb024, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, описанное в патенте США № 7,829,693.

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFNSYWIWVRQMPGKGLEWMIIPHDSDAR  
 YSPSFQGGVTFSDKSLSTAY  
 LQWSSLKASDTAMYICARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP  
 ARFSGSGSGTDFTLTISLLEP

EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

Другим примером антитела анти-CD38, которое можно применять, является MOR-202 (MOR-03087), содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно, описанные в патенте США № 8,088,896.

SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSTNY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLY

LQMNLSRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAWYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQQKPGQAPVLIYGDSCRPSGIPE  
 RFGSNGNTATLTISGTQAE

DEADYYCQTYTGGASLVFGGGKLTVLGQ

Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, раскрытых в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, могут также быть выбраны de novo из, например, библиотеки фагового дисплея, где фаг конструируется методами инженерии таким образом, чтобы экспрессировать человеческие иммуноглобулины 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). Варибельные домены, связывающие CD38, можно изолировать из, например, библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде белков, слитых с белком оболочки бактериофага pIX,

как описано в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и в международной публикации PCT № WO 09/085462). В библиотеках антител может проводиться скрининг на связывание с внеклеточным доменом человеческого CD38. Полученные положительные клоны дополнительно характеризуют, из лизатов клонов изолируют Fab и впоследствии клонируют как антитела с полной длиной. Такие способы использования фагового дисплея для изолирования человеческих антител известны в данной области. См., например, патент США № 5,223,409; патент США № 5,403,484; а также патент США № 5,571,698, патент США № 5,427,908, патент США № 5,580,717, патент США № 5,969,108, патент США № 6,172,197, патент США № 5,885,793; патент США № 6,521,404; патент США № 6,544,731; патент США № 6,555,313; патент США № 6,582,915 и патент США № 6,593,081.

Участок Fc антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Такие функции могут быть опосредованы связыванием эффекторного(-ых) домена(-ов) Fc с Fc-рецептором 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, приводит(-ят) к ингибированию и/или истощению популяции клеток-мишеней, например CD38-экспрессирующих клеток. Изоотипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 демонстрируют 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 антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством ADCC.

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

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

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

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

Без стремления к ограничению какой-либо конкретной теорией о механизме действия ожидается, что антитело анти-CD38 изобретения будет индуцировать уничтожение *in vivo* CD38-экспрессирующих клеток посредством ADCC, CDC, ADCP, апоптоза или модуляцию *in vivo* ферментативной активности CD38.

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", или "антителозависимая клеточноопосредованная 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 посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки ADCC-активности антитела анти-CD38 *in vitro* 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 в себя мононуклеарные клетки периферической крови (ПВМК) и натуральные клетки-киллеры (НК). Примеры клеток-мишеней включают в себя клетки Дауди (ATCC® CCL-213™) или клетки опухоли В-клеточного лейкоза или лимфомы, экспрессирующие CD38. В примере анализа клетки-мишени метили 20 мкКи <sup>51</sup>Cr в течение 2 ч и интенсивно промывали. Концентрацию клеток-мишеней можно скорректировать до 1×10<sup>6</sup> клеток/мл, и антитела анти-CD38 добавляют в различных концентрациях. Анализы начинали путем добавления кле-

ток Дауди в соотношении эффектор: клетка-мишень, равном 40:1. После инкубирования в течение 3 ч при 37°C анализы прекращали путем центрифугирования, и на сцинтилляционном счетчике измеряли высвобождение  $^{51}\text{Cr}$  из лизированных клеток. Процентное значение клеточной цитотоксичности можно рассчитать как процент максимального лизирования, который можно индуцировать путем добавления 3% перхлорной кислоты к клеткам-мишеням. 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 индуцировали 3% перхлорной кислоты).

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз" ("ADCP") относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. *In vitro* 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 методами инженерии с целью экспрессии GFP или другой меченой молекулы. Отношение эффектор: 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 флуоресцентного % GFP в макрофагах CD11<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> с помощью стандартных способов. 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 "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 ADCC посредством связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах. CDC для CD38-экспрессирующих клеток может измеряться *in vitro*, например, путем высевания клеток Дауди при  $1 \times 10^5$  клеток/лунка (50 мкл/лунка) 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 реакции в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакции в течение 45 мин при 37°C. Процентное значение (%) лизированных клеток может определяться как процент окрашенных пропидий йодидом клеток при анализе FACS с помощью стандартных способов. 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 методами инженерии. Человеческие IgG1 или IgG3 подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными методами инженерии 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 с FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие антитела можно получать различными способами, которые, по имеющимся данным, приводят к экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, например, за счет контроля осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применения вариантной линии CHO Lec13 в качестве клеточной линии-хозяина (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-40, 2002), применения вариантной линии клеток CHO EB66 в качестве клеточной линии-хозяина (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применения линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве клеточной линии-хозяина (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введения малой interfering RNA, специфичной к гену  $\alpha$  1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессии  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и  $\alpha$ -маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008). 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 аминокислотных положениях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует каталогу ЕС), как описано в патенте США № 6,737,056.

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 каталогу ЕС).

Другой вариант осуществления изобретения, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38, и при этом антитело анти-CD38 конкурирует в процессе связывания 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 (даратумумаб).

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 способов *in vitro*. В примере способа клетки СНО, рекомбинантно экспрессирующие CD38, могут инкубироваться с меченым даратумумабом в течение 15 мин при 4°C с последующим инкубированием с избытком флуоресцентно меченного тестового антитела в течение 45 мин при 4°C. После промывания в PBS/BSA измерение флуоресценции можно проводить с применением проточной цитометрии с помощью стандартных способов. В другом примере способа 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 регистрировать связывание тестовых биотинилированных антител с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и обнаруживать сигнал с помощью стандартных способов. Очевидно, что в конкурентных анализах можно использовать меченый даратумумаб и немеченое тестовое антитело. Тестовое антитело конкурирует с даратумумабом в процессе ингибирования даратумумабом связывания 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 картирования белков или посредством анализов на защиту водорода/дейтерия с помощью известных способов.

Другой вариант осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе, в том числе в перечисленных ниже пронумерованных вариантах осуществления, представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1) в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38. Эпитоп антитела включает в себя некоторые или все из остатков в этих областях, 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 SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одну аминокислоту в области EKVQTLEAWVIHGG (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 SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере две аминокислоты в области EKVQTLEAWVIHGG (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 SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере три аминокислоты в области EKVQTLEAWVIHGG (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 SKRNIQFSCKN1YR (SEQ ID NO: 2) и содержащим, по меньшей мере, VQLT (SEQ ID NO: 20) в области EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов 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: 20) в области EKVQTLLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

Примером антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1) или, по меньшей мере, с остатками KRN и VQLT (SEQ ID NO: 20), как показано выше, является даратумумаб, имеющий некоторые последовательности VH, VL и CDR, как описано выше. Антитела, которые связываются с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (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, 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.

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 широком 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, с  $K_D$ , равным или составляющим менее чем приблизительно  $10^{-7}$  М, например, без ограничений,  $1-9,9$  (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как  $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$  или  $9$ )  $\times 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$  или в любом входящем в него диапазоне или значении, определяемом по методу поверхностного плазмонного резонанса или методу Кипеха, как известно специалистам в данной области. В одном примере аффинность равна  $1 \times 10^{-8}$  М или менее. В другом примере аффинность равна  $1 \times 10^{-9}$  М или менее.

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 могут усиливать активность ADCC антитела анти-CD38.

"Содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахарной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное значение фукозосодержащих структур, связанных со всеми гликоструктурами. Его можно охарактеризовать и количественно измерить множеством способов, например: 1) при помощи времяпролетной ионизации лазерной десорбции с использованием матрицы (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO 2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением посредством ВЭЖХ (СВЭЖХ) с обнаружением по флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализом интактного белка нативного или фрагментированного mAb с обработкой гликанов Asn297 или без нее с Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, сохраняя фукозу связанной с первым GlcNAc; 4) расщеплением mAb на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсин или эндопептидаза Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС) или 5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования с PNGase F на Asn 297. Высвобожденные олигосахариды можно пометить флуорофором, разделить и идентифицировать различными вспомогательными методиками, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиаилирования ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно измерить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно измерить формы олигосахаридов высокоэффективным капиллярным электрофорезом с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

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

Термин "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 и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, могут индуцировать уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством апоптоза *in vitro*. Способы оценки апоптоза хорошо известны, и к ним относится, например, окрашивание аннексином IV с помощью стандартных способов. 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 и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, могут индуцировать уничтожение CD38-экспрессирующих клеток 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<sup>+</sup>, а также обеспечивающей гидролиз НАД<sup>+</sup> и цАДФР в АДФР. CD38 также катализирует обмен никотинамидной группы НАДФ<sup>+</sup> с никотиновой кислотой в условиях кислой среды с получением НКАДФ<sup>+</sup> (никотиновая кислота-аденидинуклеотидфосфат). Модуляцию ферментативной активности CD38 человека антителами анти-CD38, применяемыми в способах изобретения, можно оценить в анализе, описанном в публикации Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Например, субстрат НГД<sup>+</sup> можно инкубировать с CD38, а модуляцию продукции циклической АДФ-рибозы (цАДФР) можно отслеживать спектрофотометрически на волне возбуждения 340 нм и волне испускания 410 нм в различные моменты времени после добавления антитела с различными концентрациями. Ингибирование синтеза цАДФР можно определять в соответствии со способом ВЭЖХ, описанным в публикации Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000). Антитела анти-CD38, применяемые в способах изобретения, 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 переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную 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 применяться в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления. 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 воздействия на свойства антитела. Процентное значение идентичности можно определить, например, путем попарного выравнивания с применением настроек по умолчанию для модуля 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 осуществления 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,

улучшающие свойства антитела, например стабильность или аффинность, или улучшающие эффекторные функции 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). Когда такие замены необходимы, желательные аминокислотные замены могут определять специалисты в данной области. Аминокислотные замены могут быть осуществлены, например, с помощью ПЦР-мутагенеза (патент США № 4,683,195). 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, Thr, Trp), а также скрининга библиотек на варианты с желательными свойствами. Созданные варианты можно протестировать на их связывание с CD38, их способность индуцировать ADCC, ADCP или апоптоз *in vitro* с применением способов, описанных в настоящем документе.

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 методами инженерии с получением биспецифических антител с полной длиной. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ между двумя тяжелыми цепями моноспецифических антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как описанные в патенте США № 7,695,936; международной патентной публикации № WO 04/111233; патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2007/0287170; международной патентной публикации № WO 2008/119353; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/0286374; патентной публикации США № US 2011/0123532; международной патентной публикации № WO 2011/131746; международной патентной публикации № WO 2011/143545 или патентной публикации США № US 2012/0149876. Дополнительные биспецифические структуры, в которые могут быть встроены области VL и/или VH антител изобретения, могут представлять собой, например, иммуноглобулины с двойными варируемыми 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, патентная публикация США № 5,932,448; патент США № 6,833,441).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (BL), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (MCL).

Схема терапии антителом анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР) может обеспечить синергетическую эффективность при уничтожении клеток *in vivo* в сравнении со стандартом лечения СНОР или R-СНОР и поэтому может давать преимущества популяции пациентов в сравнении с применением только схемы СНОР или R-СНОР.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом субъект проявляет резистентность или приобрел резистентность к лечению, по меньшей мере, одним химиотерапевтическим агентом или комбинацией, по меньшей мере, одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или



можно применять различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью, включают в себя, например, ухудшение или отсутствие улучшения состояния пациента, увеличение размера опухоли, увеличение числа 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 имеется предрасположенность к развитию резистентности к, по меньшей мере, одному химиотерапевтическому агенту и антителу анти-CD20. Симптомы, связанные с раком, могут варьировать в зависимости от типа рака. Например, к симптомам, связанным с В-клеточными злокачественными заболеваниями, 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. Ремиссия при злокачественных лимфомах стандартизована в соответствии с критериями Cheson (Cheson et al., J Clin Oncology 25:579-586, 2007), и эти рекомендации могут применяться для определения того, развилась ли у субъекта резистентность по меньшей мере к одному химиотерапевтическому агенту или к комбинации по меньшей мере одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20.

Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антител, идентифицированные по их наименованиям в соответствии с официальными наименованиями лекарств в США (USAN), можно, как правило, получить в Американской медицинской ассоциации на сайте [http://\\_www\\_ama-assn\\_org](http://www_ama-assn_org), или в реестре CAS, или в реестре международных непатентованных названий (INN) по адресу [http://\\_www\\_drugs\\_com/inn\\_html](http://_www_drugs_com/inn_html).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления субъект, имеющий CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, 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 изоформы III-A. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в белке FcγRIIIa в положении 158 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 277:2 6733-40, 2002). Пациентам можно провести анализ на их полиморфизм FcγRIIIa с помощью стандартных способов.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, который включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту антитела анти-CD38 в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом субъект является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16.

#### **Введение/фармацевтические композиции**

В способах изобретения 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 приемлемую несущую среду. Несущая среда может представлять собой разбавитель, адьювант, эксципиент или носитель, 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%-й соляной раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и, по существу, не содержат твердых примесей. Затем их можно стерилизовать с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования).

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 варьироваться значительно, т.е. от менее чем около 0,5%, обычно, по меньшей мере, около 1 и до 15 или 20 мас.%, и выбирается преимущественно с учетом необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответ-

ствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые носители и составы, включая другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см. в особенности pp. 958-989.

Способом введения антитела анти-CD38 в способах изобретения 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 с помощью других средств, известных специалисту, как хорошо известно в данной области.

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

Также можно обеспечивать 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/м<sup>2</sup>. Для лечения CD38-положительного В-клеточного злокачественного заболевания обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антитела анти-CD38 в способах изобретения 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 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Антитела анти-CD38 в способах изобретения 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 и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления могут вводиться 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 однократной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч, или в любой их комбинации.

Антитела анти-CD38 в способах изобретения 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 развития 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 и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может быть лиофилизировано для хранения и может восстанавливаться перед применением в приемлемой несущей среде. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов, и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Антитело анти-CD38 в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без

исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может вводиться в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР).

Например, СНОР и его отдельные компоненты могут вводиться так, как описано в публикации Moharhmad et al., *Gun. Cancer Res* 25:4950, 2000; McKelvey et al., *Cancer* 1484-1493; 1976; Armitage et al., *J. Clin. Oncol.* 2:898-902, 1984; Skeel, R.T., *Handbook of Cancer Gliemotherapy*, 3rd Edition, Little, Browns Co., 1991:343. К типичным путям введения относятся интраперитонеальный (и/п), внутривенный (в/в) или пероральный (п/о). Схемы могут предполагать ежедневное введение, введение через сутки или каждые четвертые сутки. Типичные дозы компонентов СНОР являются следующими: циклофосфамид, разовая доза до 30 мг/кг в/в или и/п или 20 мг/кг ежедневно в течение восьми суток в/в или и/п; доксорубин, разовая доза до 6 мг/кг в/в или и/п; винкристин, разовая доза от 0,2 до 0,5 мг/кг и/п или в/в; преднизон, до 10 мг/кг/сутки в качестве отдельного средства п/о.

Например, СНОР может вводиться в дозах: циклофосфамид 30 мг/кг, доксорубин 2,5 мг/кг, винкристин 0,4 мг/кг, преднизон 0,15 мг/кг. СНОР может проводиться каждые 21 сутки при разном числе циклов. Циклофосфамид, доксорубин и винкристин могут вводиться в виде в/в инфузии. Преднизон может вводиться в форме таблетки, которая принимается ежедневно перорально в течение пяти суток в начале каждого цикла.

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

Антитело анти-CD38 в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может вводиться в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР).

Антитело анти-CD38 в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления может вводиться в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином, преднизолоном и антителом анти-CD20 ритуксимаб (R-СНОР).

Ритуксимаб может вводиться в виде внутривенной инфузии в дозе 375 мг/м<sup>2</sup> и может вводиться раз в неделю в виде 4 или 8 доз.

Комбинацию антитела анти-CD38 и СНОР можно вводить вместе с любой формой лучевой терапии, включая внешнее направленное излучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), а также любой формой радиохирургии, включая Gamma Knife, Cyberknife, Linac и интерстициальное облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GliaSite), и/или хирургическим лечением. Лучевая терапия может применяться у пациентов, имеющих массивное поражение (размер опухоли более около 10 см), или в условиях паллиативного лечения для пациентов, которые не являются кандидатами на химиотерапию.

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. Признаки вариантов осуществления изобретения, описанных выше как связанные с изобретением, раскрытым в настоящем документе, также относятся к каждому из этих дополнительно пронумерованных вариантов осуществления.

1. Антитело анти-CD38 для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР).

2. Циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон (СНОР) для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль, в комбинации с антителом анти-CD38.

3. Комбинация антитела анти-CD38, циклофосфамида, доксорубина, винкрестина и преднизона (СНОР) для применения в лечении субъекта, имеющего CD38-положительную гематологическую злокачественную опухоль.

4. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, СНОР для

применения в соответствии с вариантом осуществления 2 или комбинация в соответствии с вариантом осуществления 3, причем антитело анти-CD38 индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом антитело анти-CD38 предпочтительно индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток посредством ADCC или CDC *in vitro*.

5. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1 или 4, СНОР для применения в соответствии с вариантом осуществления 2 или 4 или комбинация для применения в соответствии с вариантом осуществления 3 или 4, причем антитело анти-CD38 конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим варируемую область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и варируемую область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

6. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, 4 или 5, СНОР для применения в соответствии с вариантом осуществления 2, 4 или 5 или комбинация для применения в соответствии с вариантом осуществления 3, 4 или 5, причем антитело анти-CD38 конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим варируемую область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и варируемую область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

7. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-6, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-6 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-6, причем антитело анти-CD38 связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну аминокислоту в области SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и содержащим по меньшей мере одну аминокислоту в области EK-VQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

8. Антитело анти-CD38, СНОР или комбинация для применения в соответствии с вариантом осуществления 7, причем антитело анти-CD38 связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере KRN в области SKRNIQF-SCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и содержащим по меньшей мере VQLT (SEQ ID NO: 20) в области EK-VQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) человеческого CD38 (SEQ ID NO: 1).

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

- (i) относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4;
- (ii) 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%;
- (iii) содержит замену в Fc антитела в аминокислотных положениях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 при нумерации остатков в соответствии с каталогом ЕС; и/или
- (iv) связывается с CD38 с аффинностью  $1 \times 10^{-9}$  или менее,  $1 \times 10^{-10}$  или менее,  $1 \times 10^{-11}$  или менее или  $1 \times 10^{-12}$  или менее.

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

- (i) последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;
- (ii) последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;
- (iii) содержит варируемую область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и варируемую область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;
- (iv) 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; или
- (v) содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

11. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-10, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-10 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-10, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (BL), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (MCL), при этом, в частности, CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL.

12. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1

или 4-11, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-11 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-11, причем:

(i) субъект является резистентным или приобрел резистентность к лечению по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом или комбинацией по меньшей мере одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20; и/или

(ii) субъект прекратил лечение по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом или комбинацией, по меньшей мере, одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20 из-за побочных эффектов.

13. Антитело анти-CD38, СНОР или комбинация для применения в соответствии с вариантом осуществления 12, причем антителом анти-CD20 является ритуксимаб (RITUXAN®), офатумумаб (ARZERA®), велтузумаб, окрелизумаб, обинутузумаб (GA-101), PRO13192 или ократузумаб (AME-133v), при этом, в частности, антителом анти-CD20 является ритуксимаб.

14. Антитело анти-CD38, СНОР или комбинация для применения в соответствии с вариантом осуществления 12 или 13, причем по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон, ифосфамид, карбоплатин или этопозид, при этом необязательно:

(i) по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой комбинацию циклофосфамида, доксорубина, винкрестина и преднизона (СНОР); или

(ii) по меньшей мере, один химиотерапевтический агент представляет собой комбинацию ифосфамида, карбоплатина и этопозиды (ICE).

15. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-14, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-14 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-14, причем антитело анти-CD38, циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон вводятся одновременно, последовательно или раздельно.

16. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-15, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-15 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-15, причем субъект получает дополнительное лечение в виде лучевой терапии.

17. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4-16, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-16 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-16, причем: (i) 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; (ii) антитело анти-CD38 представляет собой IgG1; и (iii) при этом CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL.

18. Антитело анти-CD38 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1 или 4 16, СНОР для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2 или 4-16 или комбинация для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-16, причем:

(i) 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;

(ii) антитело анти-CD38 представляет собой IgG1; и

(iii) при этом CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому Беркитта.

Пример 1. Комбинированная терапия с даратумумабом и СНОР в моделях полученной от пациента неходжкинской лимфомы (НХЛ)

Способы.

ST1361 представляет собой модель полученного от пациента ксенотрансплантата (PDX) диффузной В-крупноклеточной лимфомы (NHL-DLBCL), взятого у пациента мужского пола латиноамериканского происхождения в возрасте пятидесяти восьми лет, ранее не получавшего химиотерапии, до взятия метастатической пробы. Пациент получил лечение 8 циклами R-СНОР до резекции с последующим лечением R-ICE и R-GEMOX.

Опухоли имплантировали иммунодефицитным мышам в возрасте 5-8 недель. Когда опухоли достигли приблизительно 125-250 мм<sup>3</sup> (сутки 0), животных рандомизировали в лечебную и контрольную группы, и введение начинали в сутки 0. Даратумумаб вводили в дозе 20 мг/кг раз в неделю в течение 3 недель. СНОР и R-СНОР в описанных ниже концентрациях вводили однократно в сутки 0. СНОР (циклофосфамид: 30 мг/кг; доксорубин: 2,5 мг/кг; винкристин: 0,4 мг/кг) - В/В, СУТКИ 0; преднизон: 0,15 мг/кг, СУТКИ 0-4; R-СНОР: ритуксимаб 20 мг/кг - И/П, СУТКИ 0. Начиная с суток 0, дважды в неделю измеряли объем опухоли с помощью цифрового штангенциркуля, и для каждой группы регистрировали данные, включая отдельные значения и среднюю оценку объемов опухолей (средний TV ± стандартная ошибка среднего). Исследование проводили для оценки ингибирования роста опухоли до прекращения исследования в контрольной группе, а затем продолжали в виде исследования выживаемости для оценки

продолжительности эффективности действия даратумумаба.

В ходе исследования, начиная с суток 0, дважды в неделю измеряли размеры опухоли с помощью цифрового штангенциркуля, и для каждой группы регистрировали данные, включая отдельные значения и среднюю оценку объемов опухолей (средний TV  $\pm$  стандартная ошибка среднего). Объем опухоли (TV) рассчитывали по формуле: TV=ширина<sup>2</sup>  $\times$  длина  $\times$  0,52. % ингибирования роста опухоли (% TGI) рассчитывали для каждой группы лечения (T) в сравнении с контролем (C) с применением исходных (i) и конечных (f) измерений опухоли по формуле: % TGI=1-T<sub>f</sub>-T<sub>i</sub>/C<sub>f</sub>-C.

Результаты.

Даратумумаб в комбинации с CHOP или R-CHOP был чрезвычайно эффективным в этой модели полученной от пациента опухоли DLBCL. На сутки 31 схема CHOP сама по себе замедляла рост опухоли на около 27%, тогда как даратумумаб ингибировал рост опухоли на ~ 71%. R-CHOP была более эффективной терапией, при этом ингибирование роста опухоли составляло 82%. Комбинация даратумумаба с CHOP или R-CHOP демонстрировала регресс опухоли, и к концу исследования ни у одного из животных не наблюдалось измеримых опухолей.

Таблица 1

Лечение	Средний объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) + стандартная ошибка среднего	% TGI
Контроль изотипа	2192+160	
Даратумумаб	744+236	71%
CHOP	1634+159	27%
R-CHOP	513+104	82%
Даратумумаб/CHOP	0	107%
Даратумумаб/R-CHOP	0	107%

% TGI - процентное значение ингибирования роста опухоли.

После 31 суток 100% животных в группах даратумумаб+CHOP и даратумумаб+R-CHOP выжили, а в других группах была отмечена гибель животных вследствие прогрессирования опухоли. На фиг. 1А представлено изменение объема опухоли во времени для каждой группы лечения, а на фиг. 1В представлена медиана % выживаемости во времени. В табл. 1 показан % TGI до суток 31 исследования. В нулевые сутки объем опухоли для каждой группы составлял 145-146 мм<sup>3</sup>. Комбинация даратумумаба и CHOP приводила к 100% TGI даже через 60 суток после начала исследования.

В этом исследовании эффективность даратумумаба оценивали в модели полученной у пациента DLBCL. Этот пациент получал лечение R-CHOP и сначала демонстрировал ответ на R-CHOP, но позднее умер в результате прогрессирования заболевания. Целью настоящего исследования было определить, обеспечивает ли добавление даратумумаба большую пользу для пациентов с DLBCL. В сравнении с монотерапией (даратумумаб, CHOP или R-CHOP) добавление даратумумаба к CHOP или R-CHOP приводило к регрессии опухоли у всех животных, тогда как животные во всех других группах погибали из-за бремени заболевания. Комбинация даратумумаба с CHOP или R-CHOP демонстрировала более чем аддитивный эффект на ингибирование роста опухоли.

Пример 2. Эффективность даратумумаба в комбинации с CHOP при лимфоме Беркитта.

В качестве модели лимфомы Беркитта клетки НАМАЛЬВЫ использовали для исследования эффективности даратумумаба отдельно или в комбинации с CHOP.

Способы.

Клетки Намальвы культивировали *in vitro* в среде RPMI 1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) и L-глутамин (2 мМ) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки регулярно пересеивали дважды в неделю с обработкой трипсин-ЭДТА. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли. Мышам вводили инъекцию с  $2 \times 10^5$  клеток Намальвы в 0,1 мл PBS с Matrigel (1:1) подкожно, и лечение начинали после того, как средний размер опухоли достигал 189 мм<sup>3</sup>. Дату инокуляции опухолевых клетками обозначали как сутки 0. Основная конечная точка - определить, возможно ли замедлить рост опухоли или излечить мышей-носителей опухоли. Размеры опухолей измеряли дважды в неделю, и значения % TGI рассчитывали так, как описано в примере 1.

Результаты.

Животных разделяли на четыре группы лечения и вводили носитель (контроль изотипа), даратумумаб, CHOP или даратумумаб в комбинации с CHOP в дозировках, которые описаны в табл. 2.

Таблица 2

Группы	n	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь введени я	Схема	
1	10	Носитель (IgG)	10	и/п	QW × 3	
2	10	Даратумумаб	10	и/п	QW × 3	
3	10	СНОР	СТХ	5	в/в	QD × 5
			Доксорубицин	0,5	в/в	
			Винкристин	0,08	в/в	
			Преднизон	0,03	п/о	
4	10	Даратумумаб		10	и/п	QW × 3
		СНОР	СТХ	5	в/в	QD × 5
			Доксорубицин	0,5	в/в	
			Винкристин	0,08	в/в	
			Преднизон	0,03	п/о	

n - число животных;

и/п - интраперитонеальная инъекция;

в/в - внутривенная инъекция.

На фиг. 2 представлены результаты эффективности применения даратумумаба отдельно или в комбинации с СНОР в модели НАМАЛЬВЫ для лимфомы Беркитта. Данные о сокращении размеров опухолей (измеряемых по объему опухоли) в разных группах лечения в разные моменты времени после инокуляции опухоли представлены на фиг. 2. Средний размер опухоли в группе, получавшей носитель (группа 1), достиг 4281 мм<sup>3</sup> на сутки 26 после инокуляции опухоли. Лечение даратумумабом в дозе 10 мг/кг, СНОР и даратумумабом в дозе 10 мг/кг в комбинации с СНОР демонстрировало значительную противоопухолевую активность по размерам опухоли на сутки 26 после инокуляции опухоли отдельно. Средние размеры опухолей составляли 3017 мм<sup>3</sup> (значение T/C=70,46%, значение p < 0,001), 3304 мм<sup>3</sup> (значение T/C=77,17%, значение p=0,003) и 2303 мм<sup>3</sup> (значение T/C=53,79%, значение p < 0,001) одновременно с задержкой роста опухоли на 2, 1 и 4 суток соответственно при размере опухоли 2303 мм<sup>3</sup>.

Пример 3. Эффективность даратумумаба в комбинации с СНОР при неходжкинской лимфоме.

Основанную на линии клеток SU-DHL-6 модель NHL-DLBCL применяли для исследования эффективности использования даратумумаба отдельно или в комбинации с СНОР.

Способы.

Клетки SU-DHL-6 культивировали отдельно in vitro в среде RPMI1640 с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки (об./об.) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки регулярно пересеивали два раза в неделю. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли. Мыши NOD SCID получали  $\gamma$ -облучение (200 рад) за 24 ч до инъекции. Для развития опухоли каждой мыши в область правого бока подкожно инокулировали опухолевые клетки SU-DHL-6 ( $5 \times 10^6$ ) в 0,1 мл PBS с Matrigel (1:1). Лечение начинали, когда размер опухоли достигал приблизительно 154 мм<sup>3</sup>. Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как сутки 0. Размеры опухолей измеряли дважды в неделю, и значения % TGI рассчитывали так, как описано в примере 1.

Животных разделяли на четыре группы лечения и вводили носитель, даратумумаб, СНОР или даратумумаб в комбинации с СНОР в дозировках, описанных в табл. 3.

Результаты по размерам опухолей в разных группах в разные моменты времени после инокуляции опухоли представлены на фиг. 3. Средний размер опухоли в группе, получавшей носитель (группа 1), достиг 4281 мм<sup>3</sup> на сутки 32 после инокуляции опухоли. Лечение даратумумабом в дозе 10 мг/кг и даратумумабом в дозе 10 мг/кг в комбинации с СНОР демонстрировало значительную противоопухолевую активность по размеру опухоли на сутки 32 после инокуляции опухоли отдельно. Средние размеры опухолей составляли 1946 мм<sup>3</sup> (значение T/C=45,45%, значение p=0,006) и 1611 мм<sup>3</sup> (значение T/C=37,62%, значение p=0,002) одновременно с задержкой роста опухоли на 3 и 3,5 суток соответственно при размере опухоли 1500 мм<sup>3</sup>. Лечение СНОР могло уменьшать размер опухоли в сравнении с размером опухоли в группе, получавшей носитель, но уменьшение не позволяло добиться значимой разницы.

Таблица 3

Группы	n <sup>a</sup>	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь введения <sup>b</sup>	Схема <sup>c</sup>
1	10	Носитель (IgG)	10	и/п	QW × 4
2	10	Даратумумаб	10	и/п	QW × 4

3	10	СНОР	СТХ	5	в/в	QD × 5
			Доксорубицин	0,5	в/в	
			Винкристин	0,08	в/в	
			Преднизон	0,03	п/о	
4	10	Даратумумаб		10	и/п	QW × 4
		СНОР	СТХ	5	в/в	QD × 5
			Доксорубицин	0,5	в/в	
			Винкристин	0,08	в/в	
			Преднизон	0,03	п/о	

n - число животных;

и/п - интраперитонеальная инъекция;

в/в - внутривенная инъекция;

п/о - пероральное введение;

QD - введение дозы ежедневно;

QW - введение один раз в неделю;

СТХ - циклофосфамид.

Пример 4. Последовательная или одновременная терапия с даратумумабом в комбинации с СНОР или R-СНОР обеспечивает эффективность в моделях полученной от пациента неходжкинской лимфомы (НХЛ).

Эффективность даратумумаба отдельно или в комбинации с СНОР или R-СНОР оценивали при одновременном или последовательном введении в модели ST1361 полученной от пациента опухоли DLBCL в соответствии со способами, описанными в примере 1.

Животных разделяли на группы лечения и вводили дозы так, как показано в табл. 4. Даратумумаб и R-СНОР вводили одновременно в сутки 0 или с интервалом 7 суток.

Таблица 4

Группы	n	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Схема
1	10	Носитель (IgG)	10	и/п	QW × 3
2	10	Даратумумаб	20	и/п	QW × 3

		СНОР	СТХ	5	в/в	Сутки 0
			Доксорубицин	0,5	в/в	Сутки 0
			Винкристин	0,08	в/в	Сутки 0
			Преднизон	0,03	п/о	Сутки 0-4
3	10	Даратумумаб		20	и/п	QW x 3
		R-СНОР	Ритуксимаб	20	и/п	QW x 3
			СТХ	5	в/в	Сутки 0
			Доксорубицин	0,5	в/в	Сутки 0
			Винкристин	0,08	в/в	Сутки 0
			Преднизон	0,03	п/о	Сутки 0-4
4	10	Даратумумаб		20	и/п	Сутки 7
		R-СНОР	Ритуксимаб	20	и/п	Сутки 0
			СТХ	5	в/в	Сутки 0
			Доксорубицин	0,5	в/в	Сутки 0
			Винкристин	0,08	в/в	Сутки 0
			Преднизон	0,03	п/о	Сутки 0-4
5	10	Даратумумаб	Даратумумаб	20	и/п	Сутки 0
		R-СНОР	Ритуксимаб	20	и/п	Сутки 7
			СТХ	5	в/в	Сутки 0
			Доксорубицин	0,5	в/в	Сутки 0
			Винкристин	0,08	в/в	Сутки 0
			Преднизон	0,03	п/о	Сутки 0-4

п - число животных;

и/п - интраперитонеальная инъекция;

в/в - внутривенная инъекция;

п/о - пероральное введение;

QD - введение дозы ежедневно;

QW - введение один раз в неделю.

Сутки 0=введение в сутки 0.

Сутки 0-4=введение один раз в сутки d0-d4.

Результаты.

На фиг. 4 представлены результаты кривых роста опухолей во время ответа на лечение до 45 суток исследования. К суткам 17 опухоли в контрольной группе, получавшей носитель, достигали среднего объема 2134 мм<sup>3</sup>. К суткам 45 опухоли в группе даратумумаб+СНОР регрессировали до среднего объема 96 мм<sup>3</sup>. Опухоли у животных, получавших лечение даратумумабом и R-СНОР одновременно в сутки 0 (группа 4), полностью регрессировали к суткам 45. Опухоли у животных, получавших лечение R-СНОР в сутки 0 с последующим приемом даратумумаба в сутки 7 (группа 5), имели средний объем 998 мм<sup>3</sup>. Опухоли, лечение которых проводили даратумумабом в сутки 0 с последующим введением R-СНОР в сутки 7 (группа 6), имели средний объем 633 мм<sup>3</sup>. Исследование проводили до 101 суток. У животных, получавших лечение даратумумабом и R-СНОР одновременно в сутки 0 (группа 4), также наблюдалась полная регрессия к суткам 101.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивида с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение индивиду анти-CD38 антитела в комбинации с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (СНОР), где анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток in vitro за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 in vitro и содержит определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой цепи (H) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с последовательностями SEQ

ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и определяющую комплементарность область (CDR) легкой цепи (L) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с последовательностями SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно.

2. Способ по п.1, где анти-CD38 антитело индуцирует уничтожение CD38-экспрессирующих клеток *in vitro* за счет ADCC или CDC.

3. Способ по п.2, где анти-CD38 антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

4. Способ по п.3, где анти-CD38 антитело имеет биантенарную гликановую структуру с содержанием фукозы около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1%.

5. Способ по п.3, где анти-CD38 антитело содержит замену в Fc антитела в аминокислотном положении 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430, где нумерация остатков соответствует нумерации ЕС.

6. Способ по п.1, где 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.

7. Способ по п.6, где анти-CD38 антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

8. Способ по п.1, где CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (BL), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (MCL).

9. Способ по п.8, где CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL.

10. Способ по п.8, где индивид является резистентным или приобрел резистентность к лечению комбинацией по меньшей мере одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20.

11. Способ по п.8, где индивид прекратил лечение по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом или комбинацией по меньшей мере одного химиотерапевтического агента и антитела анти-CD20 из-за побочных эффектов.

12. Способ по п.10 или 11, где антитело анти-CD20 представляет собой ритуксимаб (RITUXAN®), офатумумаб (ARZERRA®), велтузумаб, окрелизумаб, обинутузумаб (GA-101), PRO13192 или ократузумаб (AME-133v).

13. Способ по п.12, где антитело анти-CD20 представляет собой ритуксимаб.

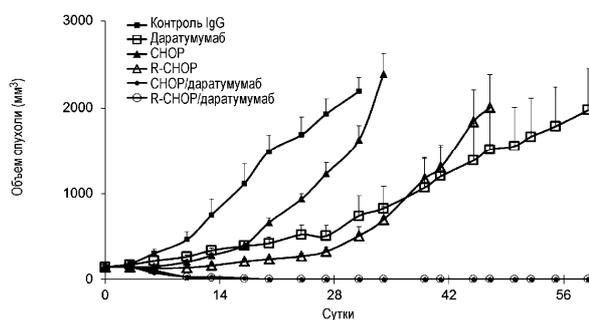
14. Способ по п.10 или 11, где по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон, ифосфамид, карбоплатин или этопозид.

15. Способ по п.14, где по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой комбинацию циклофосфамида, доксорубина, винкрестина и преднизона (СНОР).

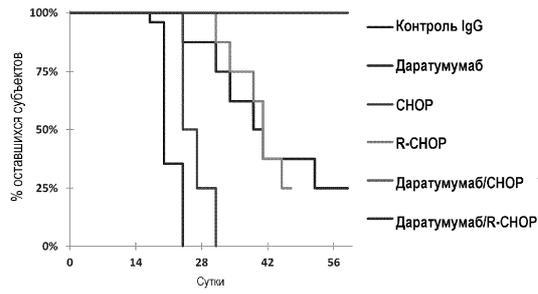
16. Способ по п.14, где по меньшей мере один химиотерапевтический агент представляет собой комбинацию ифосфамида, карбоплатина и этопозида (ICE).

17. Способ по п.1, где анти-CD38 антитело, циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон вводят одновременно или последовательно.

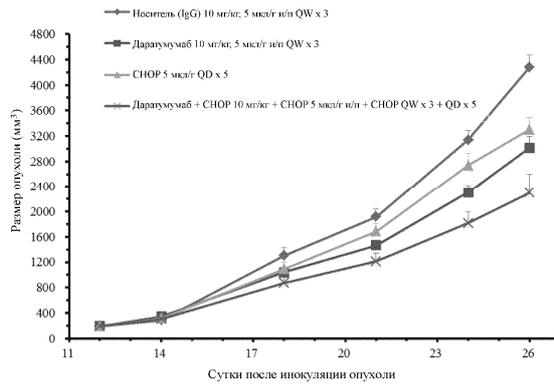
18. Способ по п.1, где пациент дополнительно получает лечение лучевой терапией.



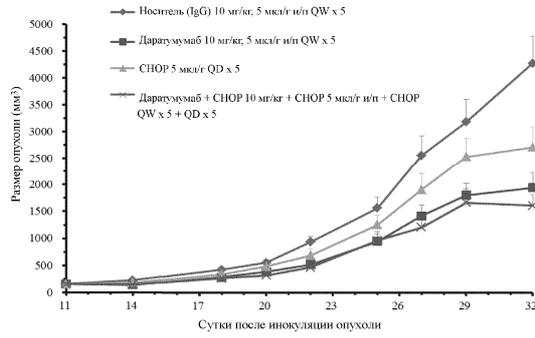
Фиг. 1А



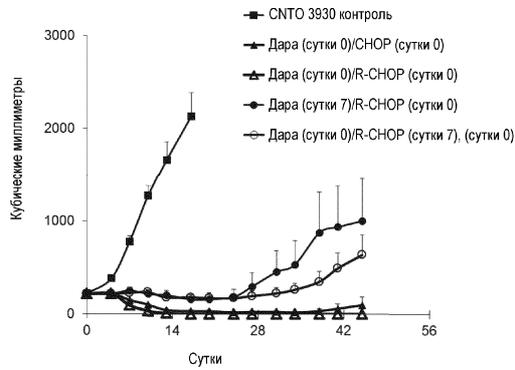
Фиг. 1В



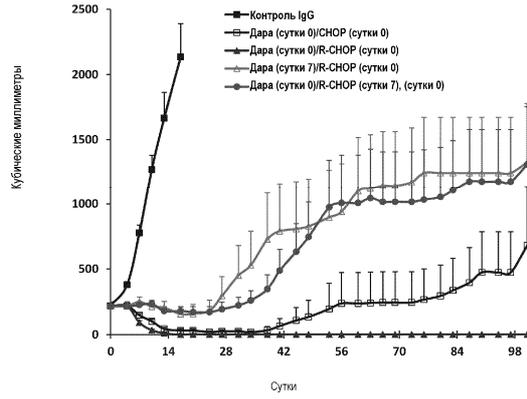
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5