

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042773**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.23**

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

**(21)** Номер заявки  
**201791186**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.12.30**

**(54) АНТИТЕЛА К CD38 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ**

**(31)** 61/428,699; 61/470,406; 61/470,382;  
61/485,104

**(32)** 2010.12.30; 2011.03.31; 2011.03.31;  
2011.05.11

**(33)** US

**(43)** 2017.10.31

**(62)** 201390993; 2011.12.30

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

**(72)** Изобретатель:  
**Элиас Кэтлин Энн, Ландес Грегори,  
Сингх Швета, Корвер Ваутер, Дрэйк  
Эндрю Уоллинг, Хаак-Френдшо Мэри,  
Снелл Гиорги Пэл, Бхаскар Винай  
(US)**

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

**(56)** WO-A2-2006125640  
LITTLE M ET AL.: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies", IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163, ISSN: 0167-5699, DOI: 10.1016/S0167-5699(00)01668-6, page 367; figure 3  
WO-A1-2006099875

PARK PETER U ET AL.: "SAR650984: A Potent Anti-CD38 Therapeutic Antibody with Three Mechanisms of Action (Apoptosis, ADCC, CDC) for Hematological Malignancies.", BLOOD, vol. 112, no. 11, November 2008 (2008-11), page 951, XP009157535, & 50TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA. USA; DECEMBER 06-09, 2008, ISSN: 0006-4971, abstract

KONG SUN-YOUNG ET AL.: "Daratumumab Directly Induces Human Multiple Myeloma Cell Death and Acts Synergistically with Conventional and Novel Anti-Myeloma Drugs", BLOOD, vol. 116, no. 21, November 2010 (2010-11), pages 1241-1242, XP009157536, & 52ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 04-07, 2010, abstract

GROEN RICHARD W ET AL.: "In Vitro and In Vivo Efficacy of CD38 Directed Therapy with Daratumumab In the Treatment of Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 116, no. 21, November 2010 (2010-11), pages 1261-1262, XP009157537, & 52ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 04-07, 2010, abstract

**(57)** Описаны выделенные антитела или их фрагменты, специфически связывающиеся с CD38 человека. Также приведены способы применения указанных антител для истощения активированных клеток, диагностики аутоиммунного заболевания, лечения гематологического рака, лечения аутоиммунного заболевания, ингибирования роста клетки, ингибирования биологической активности белка CD38 человека. Кроме того, представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела или их фрагменты, композиции, вектора и клетки-хозяева, их содержащие, а также способ получения таких антител или их фрагментов и фармацевтическая композиция, содержащая описанные антитела или их фрагменты.

**B1****042773****042773 B1**

### Уровень техники

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с § 119 (e) 35 Свода Законов США согласно заявкам США: № 61/428699, поданной 30 декабря 2010 г.; № 61/470382, поданной 31 марта 2011 г.; № 61/470406, поданной 31 марта 2011 г. и № 61/485104, поданной 11 мая 2011 г., все включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

CD38, также известный как цАДФР-гидролаза, является трансмембранным гликопротеином II типа с длинным С-концевым внеклеточным доменом и коротким N-концевым цитоплазматическим доменом. CD38 является членом группы мембраносвязанных или растворимых ферментов, содержащей CD157 и АДФР-циклазу моллюска *Aplysia*. Это семейство ферментов обладает уникальной способностью преобразовывать НАД в циклическую аденозиндифосфорибозу или никотиновая кислота-аденин-динуклеотид фосфат.

В дополнение к этому сообщалось, что CD38 участвует в мобилизации  $Ca^{2+}$  и в передаче сигнала через Туг-фосфорилирование многочисленных сигнальных молекул, в том числе фосфолипазы  $Cy$ , ZAP-70, syk и c-cbl. На основании этих наблюдений было сделано предположение, что CD38 является важной сигнальной молекулой в созревании и активации лимфоидных клеток во время их нормального развития.

Среди гемопоэтических клеток, было приписано множество функциональных эффектов CD38-опосредованному сигналингу, включая пролиферацию лимфоцитов, высвобождение цитокинов, регулирование развития и выживания В- и миелоидных клеток и индукции созревания дендритных клеток.

Тем не менее, точная роль CD38 в передаче сигнала и гемопоэзе остается неясной, так как в большинстве исследований по передаче сигнала были использованы клеточные линии, эктопически сверхэкспрессировавшие CD38 и моноклональные антитела к CD38, которые являются нефизиологическими лигандами.

Предполагаемым естественным лигандом CD38 является CD31 (PECAM-1; эндотелиальная молекула клеточной адгезии тромбоцитов-1). CD31 (молекулярная масса 130 кД) является членом суперсемейства иммуноглобулинов, которые экспрессируются на поверхности циркулирующих тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и наивных В-лимфоцитов. Функционально CD31, как полагают, действует как адгезивная молекула. Было высказано предположение, что взаимодействие CD38 с CD31 может способствовать выживаемости лейкозных клеток.

Животные модели, дефицитные по одной молекуле, во многих случаях были основополагающими средствами для понимания биологической роли молекулы в организме животного. Основополагающим допущением является то, что если белок проявляет безизбыточную функцию, то его полное отсутствие приведет к полной потере функции.

Были получены нокаутные мыши. Эти животные демонстрируют практически полную потерю активности тканевого НАД. Тем не менее, эти животные являются жизнеспособными, что приводит к выводу о том, что CD38 и его функции не являются необходимыми для жизни. Эти мыши, тем не менее, демонстрируют дефект их врожденного иммунитета и сниженный Т-клеточный гуморальный иммунный ответ.

В отличие от результатов, полученных на мышах, у человека существует сильное косвенное доказательство, что отсутствие CD38 несовместимо с жизнью. Анализы более 5000 образцов крови новорожденных не смогли определить хотя бы одного CD38<sup>-</sup>индивидуума; предполагая, что в отличие от мышей, CD38 необходим для выживания. Таким образом, не ясно, могут ли наблюдения, сделанные в отношении функции CD38 у мышей, быть экстраполированы на людей.

CD38 активируется во многих гемопоэтических злокачественных опухолях и в клеточных линиях, полученных из различных гемопоэтических злокачественных опухолей, включая неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), множественную миелому (ММ), В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ), В-клеточный и Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), Т-клеточную лимфому (ТСЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), лимфому Ходжкина (ЛХ) и хронический миелолейкоз (ХМЛ). С другой стороны, большинство примитивных плюрипотентных стволовых клеток кровяной системы являются CD38<sup>-</sup> (фиг. 1).

Несмотря на недавний прогресс в открытии и разработке противораковых средств, многие формы рака, вовлекающие в патологический процесс CD38-экспрессирующие опухоли, до сих пор имеют неблагоприятный прогноз. Таким образом, существует потребность в улучшенных способах лечения таких форм рака.

### Сущность изобретения

В настоящем документе предлагаются реагенты и способы для связывания с CD38 и способы лечения CD38-ассоциированных заболеваний и обнаружения CD38 с использованием CD38-специфических связывающих агентов, включая антитела, специфичные к CD38.

В этой связи в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения описывается выделенное антитело, специфичное к CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2). Это антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, отличающиеся тем, что вариательная область тяжелой цепи состоит из трех гипервариабельных участков (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и отличающиеся тем, что вариательная область легкой цепи также состоит из трех CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Последовательности CDR представлены:

HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 4),  
HCDR3 (SEQ ID NO: 5), LCDR1 (SEQ ID NO: 6), LCDR2 (SEQ ID NO:  
7) и LCDR3 (SEQ ID NO: 8).

В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 9. В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 9. В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 10. Данная комбинация вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи называется Ab79.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 11 и легкая цепь охватывается SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело содержит Fc-домен. В других вариантах воплощения настоящего изобретения Fc-домен является Fc-доменом человека. В других вариантах воплощения настоящего изобретения Fc-домен является вариантным Fc-доменом.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь SEQ ID NO: 11. В других вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин, клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь SEQ ID NO: 11 и выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается способ получения антитела согласно настоящему изобретению. Способ охватывает культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь SEQ ID NO: 11 и выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь SEQ ID NO: 12 в условиях, отличающихся тем, что экспрессируются выделенная нуклеиновая кислота(ы) и продуцируется антитело.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения описывается выделенное антитело, специфичное к CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2). Данное антитело состоит из шести CDR, отличающееся тем, что каждый CDR данного антитела может отличаться от SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 на 0, 1 или 2 аминокислотные замены.

В других вариантах воплощения настоящего изобретения описывается выделенное антитело, специфичное к CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2). Данное антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, отличающееся тем, что вариательная область тяжелой цепи состоит из трех гиперварибельных участков (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и отличающееся тем, что вариательная область легкой цепи также состоит из трех CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Последовательности CDR представлены:

HCDR1 (SEQ ID NO: 13), HCDR2 (SEQ ID NO: 14),  
HCDR3 (SEQ ID NO: 15), LCDR1 (SEQ ID NO: 16), LCDR2 (SEQ ID NO:  
17) и LCDR3 (SEQ ID NO: 18).

В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 19. В других вариантах воплощения настоящего выделенное антитело состоит из вариательной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 19. В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариательной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариательной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 20. Данная комбинация вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи называется Ab19.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 21 и легкая цепь охватывается SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая

кислота, кодирующая тяжелую цепь SEQ ID NO: 21. В других вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин, клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 и выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается способ продуцирования антитела согласно настоящему изобретению. Способ охватывает культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 и выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь SEQ ID NO: 22 в условиях, отличающихся тем, что экспрессируются выделенная нуклеиновая кислота(ы) и продуцируется антитело.

В других вариантах воплощения настоящего изобретения описывается выделенное антитело, специфичное к CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2). Данное антитело состоит из шести CDR, отличающееся тем, что каждый CDR данного антитела может отличаться от SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 на 0, 1 или 2 аминокислотные замены.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается выделенное антитело к CD38, специфически связывающееся с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), отличающееся тем, что антитело связывается с CD38 человека с KD приблизительно  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  или более, и связывается с CD38 яванского макака с KD приблизительно  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  или более.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются антитела, конкурирующие с Ab79 и/или Ab19 за связывание с CD38 человека и/или CD38 яванского макака.

Эти и другие варианты воплощения настоящего изобретения, признаки и потенциальные преимущества станут очевидными при ссылке на последующие описание и чертежи.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 иллюстрирует профиль экспрессии CD38 на клетках лимфоидной дифференцировки, со звездой, указывающей на высокую экспрессию CD38. Экспрессия CD38 была определена на про-В-клетках ( $CD34^+CD19^+CD20^+$ ), активированных В-клетках ( $CD19^+CD20^+$ ), плазматических клетках ( $CD138^+CD19^+CD20^+$ ), активированных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетках, НКТ-клетках ( $CD3^+CD56^+$ ) и НК-клетках ( $CD56^+CD16^+$ ). В дополнение к этому, экспрессия CD38 обнаруживается на лимфоидных клетках-предшественницах ( $CD34^+CD45RA^+CD10^+CD19^+$ ), но не лимфоидных стволовых клетках. В дополнение к этому, повышенная экспрессия CD38 наблюдается на зрелых ДК и активированных моноцитах.

Фиг. 2 демонстрирует последовательности тяжелой и легкой цепи Ab79 и Ab19.

Фиг. 3 иллюстрирует последовательности CD38 человека и яванского макака.

Фиг. 4 демонстрирует эпитопы CD38 человека, связывающиеся с каждым из антител, тестом 1 и 2, Ab19 и Ab79.

Фиг. 5 иллюстрирует повышенную экспрессию CD38 на МКПК больных СКВ с использованием коммерчески доступного антитела к CD38 человека.

Фиг. 6 иллюстрирует процентное изменение количества клеток у яванских макаков в течение 24 ч после введения дозы.

Фиг. 7 демонстрирует восстановление истощения после однократной дозы Ab79.

Фиг. 8 демонстрирует результаты значительного сокращения всех Ig изотипов у одной HuSCID мыши после однократной дозы Ab79.

Фиг. 9, сходная с фиг. 8 касательно истощающей активности Ab79 у HuSCID мышей, как описано в примерах.

Фиг. 10 иллюстрирует значительное снижение противостолбнячного ответа на HuSCID модели при лечении Ab79.

Фиг. 11 демонстрирует, вновь на HuSCID модели, значительное увеличение выживаемости при лечении Ab79, по существу на типе модели "трансплантат против хозяина".

Фиг. 12 иллюстрирует различия в экспрессии CD38 антигена на МКПК человека и мыши с использованием коммерческих антител в каждом случае.

Фиг. 13 демонстрирует терапевтический эффект в условиях воспаления, демонстрируя, что суррогатное мышинное антитело к CD38 истощает иммунные клетки из периферической крови.

#### **Подробное описание изобретения**

##### **Обзор**

Было показано, что внеклеточный домен CD38 обладает активностью бифункционального фермента, имеющего как АДФ-рибозилциклазную, так и АДФ-рибозилгидролазную активность. Таким образом, CD38 может катализировать превращение НАД<sup>+</sup> в цАДФР (циклаза) и может в дальнейшем гидролизовать ее до АДФ-рибозы (гидролаза). цАДФР участвует в мобилизации кальция из внутриклеточных запасов, что является активностью вторичного мессенджера, важной для клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Повышенная экспрессия CD38 была описана для различных заболеваний гемапоэтического проис-

хождения и была описана как отрицательный прогностический маркер при хроническом лимфобластном лейкозе. Такие заболевания включают, но не ограничиваются этим, множественную миелому (Jackson et al. (1988)), хронический лимфобластный лейкоз (Moribito et al. (2001), Jelinek et al. (2001), Chevalier et al. (2002), Durig et al. (2002)), В-клеточный хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз (Keyhani et al. (2000)), включая В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, лимфому из клеток мантийной зоны, пролимфоцитарный/миелолцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (Keyhani et al. (1993)), хронический миелоидный лейкоз (Marinov et al. (1993)), фолликулярную лимфому, НК-клеточный лейкоз и плазматочный лейкоз. Таким образом, CD38 представляет собой полезную мишень при лечении заболеваний гемопоэтической системы.

Некоторые антитела к CD38 находятся на стадии клинических исследований для лечения CD38-ассоциированного рака. В этой связи полезны антитела к CD38 с терапевтическим эффектом и/или диагностическими приложениями. Изобретение предлагает два различных набора CDR антитела к CD38, связывающиеся с различными эпитопами CD38, и связывающие формы CD38 как человека, так и яванского макака и антитела, содержащие эти CDR.

В дополнение к этому, настоящее изобретение демонстрирует, что антитела к CD38 находят применение в диагностике и/или лечении воспаления и/или иммунологических нарушений, ассоциированных с активированными лимфоцитами, в частности включая аутоиммунные заболевания. Как показано в настоящем документе, CD38 экспрессируется в незрелых гемопоэтических клетках, ингибируется в зрелых клетках и повторно экспрессируется на высоких уровнях в активированных лимфоцитах и плазматических клетках. Например, высокая экспрессия CD38 наблюдается на активированных В-клетках, плазматических клетках, активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных CD8<sup>+</sup> Т-клетках, НК-клетках НКТ-клетках, зрелых дендритных клетках (ДК) и активированных моноцитах.

Данные настоящего документа являются удивительными в силу того, что присутствие антител к CD38 было связано с диабетом, хроническим аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса (см. Antonelli et al., Clin. Exp. Immunol. 2001 126:426-431; Mallone et al., Diabetes 50:752 (2001) и Antonelli et al., J. Endocrinol. Invest. 27:695-707 (2004), все включены посредством ссылки.

В этой связи, антитела согласно настоящему изобретению находят применение в диагностике и/или лечении ряда заболеваний, включающих, но не ограничиваясь этим, аутоиммунные заболевания, рассмотренные ниже, включая, но не ограничиваясь этим, системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) и язвенный колит.

Таким образом, например, могут быть отобраны пациенты с высоким содержанием плазматических клеток, например, пациенты с СКВ, которые демонстрируют высокий уровень плазматических клеток, а также пациенты с РА, ареактивные к лечению на основе CD20.

Терапевтические антитела к CD38 согласно настоящему изобретению связываются с CD38-положительными клетками, что приводит к истощению клеток, таких как активированные лимфоциты, через многочисленные механизмы действия, включая, но не ограничиваясь этим, CDC, ADCC и пути апоптоза, приведенные в настоящем документе, ведущие к лечению и/или устранению аутоиммунных заболеваний.

Одним из преимуществ, не очевидным в некоторых клинических испытаниях антител к CD38 в онкологии, является способность связываться с CD38 яванского макака, так как эти приматы используются в доклинических испытаниях, и, следовательно, могут привести к ранней оценке дозировки, токсичности, эффективности и т.д.

#### CD38 белки

В этой связи, настоящее изобретение предлагает выделенные антитела к CD38, специфически связывающиеся с CD38 белком человека (и, как описано ниже, дополнительно и предпочтительно специфически связывающиеся с CD38 белком приматов). Как известно в данной области, CD38 белки можно обнаружить в ряде видов. Конкретно, в настоящем изобретении используются антитела, связывающиеся как с CD38 белками человека, так и приматов, особенно приматов, используемых в клиническом испытании, таких, как яванские (*Macaca fascicularis*, макак-крабод, иногда называемый в настоящем документе как "супо") макаки. "CD38 человека" или "CD38 антиген человека" относится к белку SEQ ID NO: 1 или его функциональной фракции, такой как эпитоп, указанный в настоящем документе. В общем, CD38 имеет короткий интрацитоплазматический хвост, трансмембранный домен и внеклеточный домен, в конкретных вариантах воплощения настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению связываются с внеклеточной частью CD38 белка. Под "CD38 яванского макака" в настоящем документе подразумевается SEQ ID NO: 2, которая на 92% идентична CD38 человека.

Синонимы CD38 включают ДЦФ-рибозилциклазу 1, цАДФР-гидролазу 1, CD38-rs1, гидролазу 1 циклической ДЦФ-рибозы, 1-19 и NIM-R5 антиген.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения Ab79 антитела к CD38 согласно настоящему изобретению взаимодействуют с CD38 с некоторым количеством аминокислотных остатков, включающих

K121, F135, Q139, D141, M142, D202, V203,  
H205, Q236, E239, W241, S274, C275, K276, F284, C287, V288,  
K289, N290, P291, E292, D293.

Как приведено в настоящем документе, другие антитела, взаимодействующие с этими остатками, также находят применение в терапевтических и диагностических использованиях.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела к CD38 согласно настоящему изобретению необязательно (а в некоторых случаях предпочтительно) не связываются с другими членами семейства CD38, такими как CD157. Например, предпочтительные варианты воплощения настоящего изобретения не связываются с CD157 человека с SEQ ID NO: 23 (идентификационный номер по GenBank NP\_004325).

#### Антитела

Настоящее изобретение предлагает антитела к CD38, как правило, терапевтические и/или диагностические антитела, описанные в настоящем документе. Антитела, которые находят применение в настоящем изобретении, могут принимать различные форматы, описанные в настоящем документе, в том числе традиционные антитела, а также производные, фрагменты и миметики антител, описанные ниже. По существу, изобретение предлагает структуры антител, содержащие набор 6 CDR, указанный в настоящем документе (включая небольшое количество аминокислотных замен, описанных ниже).

Традиционные структурные части антител обычно содержат тетрамер. Каждый тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярную массу приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярную массу приблизительно 50-70 кДа). Легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа и ламбда. Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь IgM1 и IgM2. Таким образом, "изотип" в контексте настоящего описания означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определенный химическими и антигенными характеристиками их константных областей. Известными изотипами иммуноглобулина человека являются IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD и IgE. Следует понимать, что терапевтические антитела могут также содержать гибриды изотипов и/или подклассов.

Амино-концевой участок каждой цепи включает вариабельную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, несущую основную ответственность за распознавание антигена. В вариабельной области три петли собраны для каждого из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи с образованием антигенсвязывающего центра антитела. Каждая из петель называется "гипервариабельный участок" (далее по тексту "CDR"), в котором вариация в аминокислотной последовательности является наиболее значимой. "Вариабельный" относится к тому факту, что среди антител определенные сегменты вариабельной области различаются по последовательности. Вариативность в вариабельной области распределена неравномерно. Вместо этого, V-область состоит из относительно инвариантных участков, называемых каркасными участками (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями со значительной изменчивостью, называемых "гипервариабельные области", каждая из которых имеет длину 9-15 аминокислот или длиннее.

Каждая VH и VL состоит из трех гипервариабельных областей ("гипервариабельные участки", "CDR") и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Гипервариабельная область, как правило, охватывает аминокислотные остатки от приблизительно аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1, "L" обозначает легкую цепь), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи, и примерно приблизительно 31-35B (HCDR1; "H" обозначает тяжелую цепь), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) и/или остатки, формирующие гипервариабельную петлю (например, остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) и 96-101 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Конкретные CDR согласно настоящему изобретению описаны ниже.

В настоящем описании система нумерации по Kabat, как правило, используется, когда речь идет об остатке в вариабельном домене (примерно, остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи) (например, Kabat et al., supra (1991)), с системой нумерации ЕС, используемой для Fc-области.

CDR способствуют образованию антиген-связывающего, или, более конкретно, эпитоп-связывающего сайта антитела. "Эпитоп" относится к детерминанте, взаимодействующей со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Эпитопы являются группами молекул, такими как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно имеют конкретные структурные характеристики, а также конкретные характеристики заряда. Один анти-

ген может иметь более одного эпитопа. Например, как показано в настоящем документе, два различных антитела, называемые в настоящем документе "Ab19" и "Ab79", связываются с различными эпитопами на CD38 молекуле.

Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантный компонент эпитопа) и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не вовлечены в связывание, например, аминокислотные остатки, которые эффективно заблокированы специфическим антиген-связывающим пептидом; другими словами, аминокислотный остаток входит в участок конкретного антиген-связывающего пептида.

Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп формируется аминокислотами, пространственно размещенными рядом, из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп формируется соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. Конформационный и неконформационный эпитопы могут быть различены тем, что связывание с первым, но не с последним, нивелируется в присутствии денатурирующих растворителей.

Как правило, эпитоп содержит, по меньшей мере, 3, и обычно более, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Антитела, распознающие один и тот же эпитоп, могут быть верифицированы простым иммунологическим анализом, демонстрирующим способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью, например, "связывание", как приведено в примерах Исследования при помощи рентгеноструктурной кристаллографии, приведенных в примерах, идентифицировали аминокислотные остатки, связывающиеся как с антителами согласно настоящему изобретению (включая Ab19 и Ab79), так и с антителами согласно известному уровню техники (тест 1 и тест 2), как продемонстрировано на фиг. 4.

В настоящем изобретении, Ab79, как приведено в примерах, взаимодействует с некоторым количеством аминокислотных остатков CD38, включая

K121, F135, Q139, D141, M142, E239, W241, S274,  
C275, K276, F284, V288, K289, N290, P291, E292 и D293.

Следует отметить, что эти остатки одинаковы как у человека, так и у яванских макаков, с тем исключением, что S274 является F274 у яванского макака. Эти остатки могут представлять иммунодоминантный эпитоп и/или остатки, входящие в участок конкретного антиген-связывающего пептида.

В настоящем изобретении, Ab19 связывается с другим эпитопом, включая

G91, E103, E1034, D105, Q107, M110, K111,  
T114, Q115, T148, V192, R194, R195, F196, A199, H228, N229,  
Q231, E233 и K234.

Следует отметить, что эти остатки одинаковы как у человека, так и у яванских макаков, с тем исключением, что M110 является V110 у яванского макака и A199 является T199 у яванского макака.

Таким образом, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела, конкурирующие с Ab79 и Ab19 путем связывания с любым из этих эпитопов, могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний. Следует отметить, что Ab79 и BM1 имеют некоторое перекрытие, таким образом антитела, конкурирующие с Ab79 и не являющиеся BM1, находят применение в настоящем изобретении.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает антитела, связывающиеся как с CD38 человека, так и CD38 яванского макака и взаимодействуют по меньшей мере с 80, 90, 95 или 98% этих остатков. Другими словами, площадь поверхности зоны взаимодействия не превышает площади этих остатков.

Карбокси-концевой участок каждой цепи определяет константную область, несущую основную ответственность за эффекторную функцию. Kabat et al., собрали многочисленные первичные последовательности переменных областей тяжелых цепей и легких цепей. В зависимости от степени сохранения последовательности, они классифицировали отдельные первичные последовательности в CDR и каркасном участке и создали их список (см. Sequences of immunological interest, 5<sup>th</sup> edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., работа включена во всей своей полноте посредством ссылки).

В подклассе иммуноглобулинов IgG существует несколько доменов иммуноглобулина в тяжелой цепи. Под "доменом иммуноглобулина (Ig)" в настоящем документе подразумевается область иммуноглобулина, имеющая четкую третичную структуру. Доменами тяжелых цепей, представляющими интерес для настоящего изобретения, являются включающие константные тяжелые домены (CH) и домены шарнира. В контексте IgG антител, каждый из IgG изоформ имеет три CH-области. Соответственно, "CH" доменами в контексте IgG являются следующие: "CH1" относится к позиции 118-220 в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat. "CH2" относится к позиции 237-340 в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat и "CH3" относится к положениям 341-447 в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat.

Другим типом Ig-домена тяжелой цепи является шарнирная область. Под "шарниром" или "шарнирной областью" или "шарнирной областью антитела" или "шарнирной областью иммуноглобулина" в настоящем документе подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. Структурно CH1-домен IgG заканчивается в позиции по ЕС 220 и CH2-домен IgG начинается с остатка в позиции по ЕС 237. Таким образом, для IgG шарнир антите-

ла в настоящем документе определен как включающий позиции 221 (D221 в IgG1) до 236 (G236 в IgG1), в котором нумерация осуществляется в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, например, в контексте Fc-области, включен нижний шарнир, с "нижним шарниром", как правило относящимся к позициям 226 или 230.

Особый интерес для настоящего изобретения представляют Fc-области. Под "Fc" или "Fc-областью" или "Fc-доменом" в контексте настоящего описания подразумевается полипептид, содержащий константную область антитела за исключением первой константной области домена иммуноглобулина и в некоторых случаях части шарнира. Таким образом, Fc относится к двум последним константным областям доменов иммуноглобулина IgA, IgD, и IgG, последним трем константным областям доменов иммуноглобулина IgE и IgM и гибкого шарнира N-конца этих доменов. Для IgA и IgM Fc может включать J цепь. Для IgG Fc-область иммуноглобулина состоит из доменов C $\gamma$ 2 и C $\gamma$ 3 (C $\gamma$ 2 и C $\gamma$ 3) и нижней шарнирной области между C $\gamma$ 1 (C $\gamma$ 1) и C $\gamma$ 2 (C $\gamma$ 2). Хотя границы Fc-области могут варьировать, тяжелая цепь Fc-области IgG человека, как правило, определяется, как включающая остатки C226 или P230 к его карбоксильному концу, в котором нумерация осуществляется в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat. В некоторых вариантах воплощения изобретения, как это более подробно описано ниже, в Fc-область внесены аминокислотные модификации, например, для изменения связывания с одним или более Fc $\gamma$ R-рецепторами или с FcRn-рецептором.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела являются полноразмерными антителами. Под "полноразмерным антителом" в настоящем документе подразумевается структура, которая представляет собой естественные биологические формы антител, включая переменные и константные области, включая одну или несколько модификаций, приведенных в настоящем документе.

Кроме того, антитела могут быть различными по структуре, включая, но не ограничиваясь фрагментами антител, моноклональными антителами, биспецифическими антителами, миниантителами, доменными антителами, синтетическими антителами (иногда называемыми в настоящем документе "миметики антител"), химерными антителами, гуманизированными антителами, слитыми антителами (иногда называемыми "конъюгаты антител"), а также фрагментами каждого из них, соответственно. Структуры, которые по-прежнему полагаются.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело является фрагментом антитела. Специфические фрагменты антител включают, но не ограничиваются,

- (i) Fab-фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1-доменов;
- (ii) Fd-фрагмент, состоящий из VH и CH1-доменов;
- (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH-доменов одного антитела;
- (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, работа включена во всей своей полноте посредством ссылки), состоящий из одной переменной области;
- (v) изолированные CDR-области;
- (vi) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащим два связанных Fab-фрагмента;
- (vii) одноцепочечные Fv-молекулы (scFv), в которых VH-домен и VL-домен соединены пептидным линкером, позволяющим двум доменам ассоциироваться с образованием антигенсвязывающего сайта (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, работы включены во всей своей полноте посредством ссылки);
- (viii) биспецифические одноцепочечные Fv (WO 03/11161, включенный в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки) и
- (ix) "диатела" или "тритела", мультивалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированным посредством слияния генов (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, работы включены во всей своей полноте посредством ссылки).

#### Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитело может быть комбинацией различных видов, например, химерное антитело и/или гуманизированное антитело. То есть в настоящем изобретении наборы CDR могут быть использованы с каркасными участками и константными областями, отличными от конкретно описанных последовательностью в настоящем документе.

В целом, как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, содержащим области более, чем одного вида. Например, традиционно "химерные антитела" содержат переменную область (области) мыши (или крысы в некоторых случаях) и константную область (области) человека. "Гуманизированные антитела" в целом относятся к нечеловеческим антителам, которые имели переменные домены каркасных участков, замещенные последовательностями, обнаруженными в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело, за исключением CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично этому антителу, за исключением его CDR. CDR, некоторые или все, которые кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из организмов, не являющихся человеком, пересаживают в бета-складчатый каркасный участок переменного участка антитела человека для создания антитела, специфичность которого определяется переса-



женными CDR. Создание таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, все работы включены во всей своей полноте посредством ссылки. Для восстановления аффинности, которая теряется в исходной конструкции при пересадке, часто требуется "обратная мутация" избранных аминокислотных остатков акцепторного каркасного участка на соответствующие донорные аминокислотные остатки (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, все включены во всей своей полноте посредством ссылки). Оптимально гуманизованное антитело также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека, и, следовательно, будет типично содержать Fc-область человека. Гуманизованные антитела также могут быть получены с использованием мышей с генетически сконструированной иммунной системой. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, включен во всей своей полноте посредством ссылки. В данной области хорошо известны различные методики и способы гуманизации и реконструирования антител, не принадлежащих человеку (см. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), и приведенные в этом документе ссылки, все включены во всей своей полноте посредством ссылки). Способы гуманизации включают, но не ограничиваются способами, описанными в работах Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9; Presta et al., 1997, Cancer Res. 57 (20) :4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, все работы включены во всей своей полноте посредством ссылки. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности переменных областей антител, не являющихся человеческими, могут включать способы восстановления поверхности, как описано, например, в работе Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, включенной во всей своей полноте посредством ссылки. В одном варианте воплощения настоящего изобретения исходное антитело является аффинно созревшим, как это известно в данной области техники. Для гуманизации и аффинного созревания возможно применять структурные способы, как, например, описано в USSN 11/004590. Для гуманизации и/или аффинного созревания переменных областей антител возможно применять селекционные способы, которые включают, но не ограничиваются способами, описанными в работах Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272 (16) :10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, все включены во всей своей полноте посредством ссылки. Другие способы гуманизации могут включать пересадку только частей CDR, эти способы включают, но не ограничиваются способами, описанными в работах USSN 09/810510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, все включены во всей своей полноте посредством ссылки.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению могут быть мультиспецифическими антителами и, особенно биспецифическими антителами, также иногда называемыми "диателами". Они являются антителами, связывающимися с двумя (или более) различными антигенами или различными эпитопами одного антигена. Диатела возможно изготовить различными способами, известными в данной области техники (Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, включен во всей своей полноте посредством ссылки), например, получив химическим путем или из гибридных гибридом.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело является миниантителом. Миниантитела являются доведенными до минимума антителоподобными белками, включающими scFv, присоединенными к CH3-домену. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, включен во всей своей полноте посредством ссылки. В некоторых случаях scFv может быть присоединен к Fc-области, и может включать некоторую часть или всю шарнирную область.

Антитела согласно настоящему изобретению обычно являются выделенными или рекомбинантными. Термин "выделенный", используемый для описания различных полипептидов, описанных в настоящем документе, означает полипептид, который был идентифицирован и отделен и/или выделен из клеток или клеточной культуры, в которой экспрессировался. Как правило, выделенный полипептид будет подготовлен, по меньшей мере, одной стадией очистки. "Выделенное антитело" означает антитело, которое по существу не содержит других антител, имеющих различные антигенные свойства. Например, выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от CD38.

Выделенное антитело, специфически связывающееся с эпитопом, изоформа или вариант CD38 человека или CD38 яванского макака может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, других видов, таких как видовые гомологи CD38. Более того, выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Выделенные моноклональные антитела, имеющие различные свойства, могут быть объединены в хорошо определенной композиции. Так, например, Ab79 и Ab19 могут быть объединены в одной лекар-

ственной форме, если это необходимо.

Антитела к CD38, согласно настоящему изобретению, специфически связывают CD38-лиганды (например, CD38 белки SEQ ID NO: 1 и 2 человека и яванского макака). "Специфическое связывание" или "специфически связывается с" или "специфичное для" конкретного антигена или эпитопа означает связывание, заметно отличающееся от неспецифического взаимодействия.

Специфическое связывание может быть измерено, например, посредством определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно является молекулой аналогичной структуры, которая не имеет связывающей активности. Например, специфическое связывание может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, схожей с мишенью.

Специфическое связывание для конкретного антигена или эпитопа может демонстрироваться, например, антителом, имеющим KD для антигена или эпитопа по меньшей мере приблизительно  $10^{-4}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-5}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-6}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-7}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-8}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-9}$  M, альтернативно по меньшей мере приблизительно  $10^{-10}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-11}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-12}$  M, или более, где KD относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, специфически связывающее антиген, будет иметь KD в 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10000- и в более раз выше для контрольной молекулы по отношению к антигену или эпитопу.

Кроме того, специфическое связывание с конкретным антигеном или эпитопом может демонстрироваться, например, антителом, имеющим KA или Ka для антигена или эпитопа по меньшей мере в 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10000- или более раз больше для эпитопа по сравнению с контролем, где KA или Ka относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

#### Модификации антител

Настоящее изобретение дополнительно предлагает вариант антител. То есть существует ряд модификаций для антител согласно настоящему изобретению, которые могут быть проведены, включающие, но не ограничивающиеся модификациями аминокислот в CDR (аффинное созревание), модификациями аминокислот в Fc-области, вариантами гликозилирования, ковалентными модификациями других типов и т.д.

Под "вариантной" в настоящем документе подразумевается полипептидная последовательность, отличающаяся от исходного полипептида посредством по меньшей мере модификации одной аминокислоты. Аминокислотные модификации могут включать замены, инсерции и делеции, причем первая модификация является предпочтительной во многих случаях.

Как правило, варианты могут включать любое количество модификаций до момента сохранения функции белка, описанной в настоящем документе. То есть в случае аминокислотных вариантов, протестированных с CDR либо Ab79, либо Ab19, например, антитело должно по-прежнему специфически связываться как с CD38 человека, так и CD38 яванского макака. Аналогично, если аминокислотные варианты протестированы с Fc-областью, например, варианты антитела должны поддерживать необходимые функции связывания рецептора для конкретного применения или показания для антитела.

Однако, как правило, используются 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из используемых аминокислотных замен, и часто целевой результат преследует изменение функции с минимальным количеством модификаций. В некоторых случаях, проводится от 1 до 5 модификаций, с от 1-2, 1-3 и 1-4 также находящими применение во многих вариантах воплощения настоящего изобретения.

Следует отметить, что количество аминокислотных модификаций может быть в пределах функциональных доменов: например, желательными могут быть от 1-5 модификации в Fc-области дикого типа или генно-инженерных белков, а также от 1 до 5 модификаций в Fv-области, например. Вариантная последовательность полипептида предпочтительно будет иметь, по меньшей мере, приблизительно 80, 85, 90, 95 или до 98 или 99% идентичности исходной последовательности (например, вариабельные области, константные области и/или тяжелые и легкие цепи последовательностей для Ab79 и/или Ab19). Следует отметить, что в зависимости от размера последовательности, процент идентичности будет зависеть от количества аминокислот.

Под "аминокислотной заменой" или "заменой" в настоящем документе подразумевается замена аминокислоты в определенной позиции в исходной полипептидной последовательности другой аминокислотой. Например, замена S100A относится к вариантному полипептиду, в котором серин в положении 100 заменен на аланин. Под "инсерцией аминокислоты" или "инсерцией" в контексте настоящего описания подразумевается добавление аминокислоты в конкретное положение в исходной полипептидной последовательности. Под "делецией аминокислоты" или "делецией" в контексте настоящего описания подразумевается удаление аминокислоты в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности.

Под "исходным полипептидом", "исходным белком", "полипептидом-предшественником" или "белком-предшественником" в контексте настоящего описания подразумевается немодифицированный полипептид, который последовательно модифицируется для создания варианта. В общем, исходными полипептидами в настоящем документе являются Ab79 и Ab19. Исходный полипептид может относиться к

непосредственно полипептиду, композициям, содержащим исходный полипептид, или аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Соответственно "исходный Fc-полипептид" в контексте настоящего описания подразумевает Fc-полипептид, модифицированный для создания варианта, а "исходное антитело" в контексте настоящего описания подразумевает антитело, модифицируемое для создания вариантного антитела.

Под "диким типом" или "ДТ" или "нативным" в настоящем документе подразумевается аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность, встречающаяся в природе, включая аллельные варианты. ДТ белок, полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG и т.д. имеет аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

Под "вариантной Fc-областью" в настоящем документе подразумевается Fc-последовательность, отличающаяся от Fc-последовательности дикого типа посредством, по меньшей мере, модификации одной аминокислоты. Вариантный Fc может относиться к непосредственно Fc-полипептиду, композициям, содержащим вариантный Fc-полипептид или аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения одна или более аминокислотных модификаций выполнены в одном или более CDR антитела (либо Ab79, либо Ab19). Как правило, только 1 или 2 или 3 аминокислоты замещаются в любом единичном CDR и, как правило, не более, чем от 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изменений вносятся в пределах набора CDR. Тем не менее, следует понимать, что любая комбинация отсутствия замен, 1, 2 или 3 замен в любом CDR могут независимо и необязательно сочетаться с любой другой заменой.

В некоторых случаях аминокислотные модификации в CDR называются "аффинным созреванием". "Аффинно созревшим" антителом является антитело, имеющее одну или более альтераций в одном или более CDR, что приводит к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим тех альтераций. В некоторых случаях, хотя и редко, желательным может быть уменьшение аффинности антитела к его антигену, но это, как правило, не является предпочтительным.

Аффинное созревание может быть осуществлено для увеличения аффинности связывания антитела с антигеном, по меньшей мере, приблизительно с 10% до 50-100-150% или более, или от 1 до 5 раз по сравнению с "исходным" антителом. Предпочтительные аффинно зрелые антитела будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности к антигену-мишени. Аффинно зрелые антитела получают при помощи известных процедур. См., например, работу Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783, в которой описано аффинное созревание путем перестановки доменов вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL). Случайный мутагенез CDR и/или аминокислотных остатков каркасных участков описан в работах Barbas, et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; и Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, например.

Кроме того, аминокислотные модификации могут быть проведены в одном или нескольких CDR антитела согласно настоящему изобретению, которые являются "молчащими", например, которые существенно не изменяют аффинности антитела к антигену. Это может быть осуществлено по ряду причин, в том числе для оптимизации экспрессии (что может быть проведено для нуклеиновых кислот, кодирующих антитела согласно настоящему изобретению).

Таким образом, включенными в определение CDR и антител согласно настоящему изобретению являются вариантные CDR и антитела, т.е. антитела согласно настоящему изобретению могут включать аминокислотные модификации в одном или нескольких CDR Ab79 и Ab19. В дополнение к этому, как приведено ниже, аминокислотные модификации также могут независимо и необязательно проводиться в любой области вне CDR, включая каркасные участки и константные области.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения описаны вариантные антитела Ab79 и Ab19, специфичные для CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2). Данное антитело состоит из шести CDR, отличающееся тем, что каждый CDR данного антитела может отличаться от SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 на 0, 1 или 2 аминокислотные замены. В других вариантах воплощения настоящего изобретения вариантное антитело к CD38 состоит из шести CDR, отличающееся тем, что каждый CDR данного антитела может отличаться от SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 на 0, 1 или 2 аминокислотные замены.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела к CD38 согласно настоящему изобретению состоят из вариантного Fc-домена. Как известно в данной области техники, Fc-область антитела взаимодействует с рядом Fc-рецепторов и лигандов, передавая массив важных функциональных возможностей, называемых эффекторные функции. Данные Fc-рецепторы, включают, но не ограничиваются (у человека) FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2), и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158, коррелирующие с антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и

FcγRIIIb-NA2), FcRn (неонатальный рецептор), C1q (комплементарный белок, вовлеченный в комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC)) и FcRn (неонатальный рецептор, вовлеченный в сывороточный полураспад). Подходящие модификации могут быть проведены в одном или более положениях, в общем приведенных, например, в заявке на патент US 11/841654 и ссылки в них, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341769, патенте US № 6737056, патенте US № 7670600, патенте US № 6086875, все включены во всей своей полноте посредством ссылки, и в частности для конкретных аминокислотных замен, увеличивающих связывание с Fc-рецепторами.

В дополнение к модификациям, приведенным выше, могут быть выполнены другие модификации. Например, молекулы могут быть стабилизированы путем введения дисульфидных мостиков, связывающих VH и VL домены (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, работа включена во всей своей полноте посредством ссылки). В дополнение к этому, существуют различные ковалентные модификации антител, которые могут быть проведены, приведены ниже.

Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего изобретения, и, как правило, но не всегда, проведены посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций антитела вводятся в молекулу путем реакции специфических аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, способным реагировать с избранными боковыми цепями или N-, или C-концевыми остатками.

Остатки цистеинила наиболее часто вступают в реакцию с α-галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид для создания карбоксиметил- или карбоксиамидометил-производных. Остатки цистеинила также могут быть дериватизированы реакцией с бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлоруксусным фосфатом, N-алкилмалеинимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-оксо-1,3-оксадиазолом и тому подобное.

Остатки гистидила дериватируются реакцией с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как этот агент относительно специфичен для боковой цепи гистидила. Также используется парабромфенацилбромид, реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М натрия какодилата при pH 6,0.

Лизинил и терминальные аминокислотные остатки вступают в реакцию с янтарным или другими ангидридами карбоновых кислот. Дериватизация с этими агентами имеет эффект изменения заряда остатков лизинила. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-амино-содержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксаль фосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфоновую кислоту; 0-метилизомочевину, 2,4-пентандион и реакцию с глиоксилатом, катализируемую трансаминазой.

Остатки аргинила модифицируют путем реакции с одним или несколькими общепринятыми реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует проведения реакции в щелочных условиях из-за высокой pKa функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также ε-аминогруппой аргинина.

Специфическая модификация остатков тирозина может быть проведена, особый интерес представляет введение спектральных меток в остатки тирозина путем реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометана. Чаще всего используются N-ацетилимидазол и тетранитрометан для образования соединений O-ацетилтирозила и 3-нитропроизводных, соответственно. Остатки тирозила йодируются с использованием I<sup>125</sup> или I<sup>131</sup> для создания меченых белков для использования в радиоиммунном анализе, описанный выше способ с использованием хлорамина T является подходящим.

Боковые карбоксильные группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют путем реакции с карбодиимидами (R<sup>1</sup>--N=C=N--R'), где R и R' необязательно являются различными алкильными группами, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамина преобразуются в остатки аспарагина и глутаминила путем взаимодействия с ионами аммония.

Дериватизация при помощи бифункциональных агентов полезна для перекрестного сшивания антител с водонерастворимой поддерживающей матрицей или поверхностью для использования в различных способах, в дополнение к способам, описанным ниже. Обычно используемые агенты для перекрестного сшивания включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные эфиры, например, эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(пара-азидофенил)дителио]пропиоимидат позволяют получить фотоактивируемые промежуточные продукты, способные к образованию поперечных сшивок в присутствии света. Альтернативно, высокореактивные водонерастворимые матрицы, такие как "synopolgusogen" бромид-активированные углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах US №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, все включены во всей своей полно-

те посредством ссылки, используемые для иммобилизации белков.

Остатки глутамила и аспарагина часто деаминируют для получения соответствующих остатков глутамила и аспартила, соответственно. Альтернативно эти остатки деаминируют в мягких кислых условиях. Оба способа образования этих остатков входят в объем настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], работа включена во всей своей полноте посредством ссылки), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

В дополнение к этому, что будет понятно специалистам в данной области техники, метки (включая флуоресцентные, ферментные, магнитные, радиоактивные и т.д. все могут быть добавлены к антителам (а также другие композиции согласно настоящему изобретению).

#### Гликозилирование

Другим типом ковалентной модификации являются изменения в гликозилировании. В другом варианте воплощения настоящего изобретения антитела, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы для включения одной или более сконструированных гликоформ. Под "сконструированной гликоформой" в контексте настоящего описания подразумевается углеводная композиция, ковалентно присоединенная к антителу, в котором указанная углеводная композиция химически отличается от углеводной композиции исходного антитела. Сконструированные гликоформы могут быть полезны для различных целей, включая, но не ограничиваясь, усилением или снижением эффекторной функции. Предпочтительным способом образования сконструированной гликоформы является афукозилирование, которое, как было показано, коррелирует с увеличением ADCC функции, предположительно за счет тесной связи с рецептором Fc $\gamma$ R-IIIa. В контексте настоящего описания "афукозилирование" означает, что большая часть антитела, продуцируемого в клетках-хозяевах, по существу, свободна от фукозы, например, 90-95-98% образуемых антител не содержат фукозу в качестве существенного компонента углеводного остатка антитела (обычно прикрепленного к N297 в Fc-области). Определено функционально, что афукозилированные антитела обычно имеют по меньшей мере 50%-ную или большую аффинность к рецептору Fc $\gamma$ R-IIIa.

Сконструированные гликоформы могут быть созданы с использованием различных способов, известных в данной области техники (Umaña et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001, *Bio-technol Bioeng* 74:288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473; US 6602684; USSN 10/277370; USSN 10/113929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1, все работы включены во всей своей полноте посредством ссылки; (Potelligent® technology [Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси]; GlycoMAb® glycosylation engineering technology [Glycart Biotechnology AG, Цюрих, Швейцария]). Многие из этих методик основаны на регулировании уровня фукозилированных и/или разветвленных олигосахаридов, ковалентно присоединенных к Fc-области, например, путем экспрессии IgG в различных организмах или клеточных линиях, сконструированных или созданных иным способом (например, клетки Lec-13 CHO или клетки гибридомы крысы YB2/0, путем регулирования ферментов, вовлеченных в путь гликозилирования (например, FUT8 [ $\alpha$ 1,6-фукозилтрансферазы] и/или  $\beta$ 1-4-N-ацетилглюкозаминтрансферазы III [GnTIII]), либо путем модификации углевода(ов) после экспрессии IgG. Например, "сахар сконструированное антитело" или "SEA технология" Seattle Genetics функционирует путем добавления модифицированных Сахаров, ингибирующих фукозилирование в процессе производства; см., например, 20090317869, включенная в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки. Сконструированная гликоформа как правило относится к различному углеводу или олигосахариду; таким образом, антитело может включать сконструированную гликоформу.

Альтернативно сконструированная гликоформа может относиться к вариантному IgG, содержащему различный углевод или олигосахарид. Как известно в данной области техники, гликозилирование может зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, пригодных для гликозилирования, рассмотрены ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в котором продуцируется белок. Отдельные экспрессионные системы рассмотрены ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно происходит либо через N-связь, либо через O-связь. N-гликозилирование относится к присоединению углеводного остатка к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X - любая аминокислота, кроме пролина, являются последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводного остатка к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной кислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Включение сайтов гликозилирования в антитело удобно осуществлять путем изменения аминокис-

лотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-гликозилирования). Изменение также может быть проделано путем добавления или замещения одного или нескольких остатков серина или треонина для начала последовательности (для сайтов O-гликозилирования). Для удобства аминокислотная последовательность антитела предпочтительно модифицируется в результате изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутирования ДНК, кодирующей полипептид-мишень в заранее выбранных основаниях, так, чтобы образовывались кодоны, которые будут транслироваться в желаемые аминокислоты.

Другими способами увеличения числа углеводных остатков на антителе является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. Эти процедуры имеют преимущество, поскольку они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, имеющей гликозилирующие способности к N- и O-гликозилированию. В зависимости от используемого способа присоединения, сахар(а) может быть присоединен к

- (а) аргинину и гистидину,
- (б) свободным карбоксильным группам,
- (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина,
- (г) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина,
- (д) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или
- (е) амидной группе глутамина.

Данные способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, работы включены во всей своей полноте посредством ссылки.

Удаление углеводных остатков, присутствующих в исходном антителе (например, посттрансляционно), может быть реализовано химически или ферментативно. Для химического дегликозилирования необходимо воздействие на белок трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связанного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептид интактным. Химическое дегликозилирование описано в работах Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131, которые включены во всей своей полноте посредством ссылки. Ферментативное отщепление углеводных остатков полипептидов может быть достигнуто путем использования различных эндо- и экзогликозидаз, как описано в работе Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, включенной во всей своей полноте посредством ссылки. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования возможно предотвратить путем использования соединения туникамицина, как описано в работе Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, включенной во всей своей полноте посредством ссылки. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных связей.

Другой тип ковалентной модификации антитела включает присоединение антитела к различным небелковым полимерам, включающим, но не ограниченным, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, способом, описанным в, например, 2005-2006 PEG Catalog from Nektar Therapeutics (доступен на веб-сайте Nektar) патенты US 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337, все работы включены во всей своей полноте посредством ссылки. В дополнение к этому, как известно в данной области техники, аминокислотные замены могут быть реализованы в различных позициях в антителе для облегчения присоединения полимеров, таких как ПЭГ. См., например, публикацию US № 2005/0114037 A1, включенную во всей своей полноте посредством ссылки.

#### Варианты воплощения конкретных CDR и вариативных областей

Настоящее изобретение предлагает некоторое количество антител, каждое из которых имеет конкретный набор CDR (включая, как приведено выше, некоторые аминокислотные замены). Как приведено выше, эти антитела могут характеризоваться набором 6 CDR, вариабельными областями или полноразмерными тяжелыми и легкими цепями, включая константные области. В дополнение к этому, как приведено выше, могут быть осуществлены аминокислотные замены. В общем, в контексте изменений в структуре CDR, в связи с относительно короткой длиной CDR, аминокислотные модификации, как правило, характеризуются количеством аминокислотных модификаций, которые могут быть проведены. Хотя это также применимо к обсуждению количества аминокислотных модификаций, которые могут быть осуществлены в вариабельных, константных или полноразмерных последовательностях, в дополнение к ряду изменений, следует определить эти изменения в "% идентичности". Таким образом, как описано в настоящем документе, антитела, включенные в объем настоящего изобретения, идентичны на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% последовательностям SEQ ID NO: , перечисленным в настоящем документе.

В контексте Ab79 антитела, набор CDR является следующим: три CDR тяжелой цепи охватывают HCDR1 SEQ ID NO: 3 (HCDR1), SEQ ID NO: 4 (HCDR2) и SEQ ID NO: 5 (HCDR3) и три CDR легкой цепи охватывают

SEQ ID NO: 6 (LCDR1), SEQ ID NO: 7 (LCDR2) и SEQ ID NO: 8 (LCDR3).

В контексте Ab19, набор CDR является следующим:

HCDR1 (SEQ ID NO: 13), HCDR2 (SEQ ID NO: 14) и HCDR3 (SEQ ID NO: 15), и LCDR1 (SEQ ID NO: 16), LCDR2 (SEQ ID NO: 17) и LCDR3 (SEQ ID NO: 18).

В частности, исключенными из настоящего изобретения являются антитела с SEQ ID NO: 24 и 25 (тяжелые и легкие цепи теста 1) и с SEQ ID NO: 26 и 27 (тяжелые и легкие цепи теста 2). Следует отметить, что эти антитела не являются перекрестнореактивными с CD38 яванского макака, рассмотренного ниже.

Антитела согласно настоящему изобретению являются перекрестнореактивными с CD38 человека и CD38 яванского макака и, таким образом, являются межвидовыми перекрестнореактивными антителами. "Межвидовое перекрестнореактивное антитело" является антителом, обладающим аффинностью связывания с антигеном, характерной для первого вида млекопитающего, которая является практически идентичной аффинности связывания гомолога этого антигена вторым видом млекопитающего. Межвидовая перекрестная реактивность может быть выражена, например, как соотношение KD антитела для антигена первого вида млекопитающего к KD того же антитела для гомолога того же антигена второго вида млекопитающего, где соотношение составляет 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 5, 10, 15 до 20. Альтернативно или дополнительно, антитело обладает "межвидовой перекрестной реактивностью", если оно демонстрирует терапевтическую или диагностическую эффективность при введении второму виду. Таким образом, в данном случае, антитела согласно настоящему изобретению являются перекрестнореактивными с CD38 яванского макака, демонстрирующими доклиническую эффективность при введении яванским макакам и, таким образом, считаются перекрестнореактивными.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются антитела, конкурирующие с антителами согласно настоящему изобретению (например, с Ab79 и/или Ab19) за связывание с CD38 человека и/или CD38 яванского макака, но не включены ни BM1, ни BM2. Конкуренция за связывание с CD38 или частью CD38 двумя или более антителами к CD38 может быть определена любой подходящей методикой, как известно в данной области техники.

Конкуренция в контексте настоящего изобретения относится к любому обнаруживаемому значительному снижению способности антитела согласно настоящему изобретению (например, Ab79 или Ab19) связывать своего конкретного партнера по связыванию, например, CD38, в присутствии исследуемого соединения. Как правило, конкуренция подразумевает, по меньшей мере, приблизительно 10-100%-ное снижение связывания антитела согласно настоящему изобретению с CD38 в присутствии конкурента, что измерено стандартными методиками, такими как ELISA или анализы Viacore®. Так, например, возможно установить критерии конкурентоспособности, при которых определяется по меньшей мере приблизительно 10%-ное относительное ингибирование связывания, определяется по меньшей мере приблизительно 15%-ное относительное ингибирование связывания или определяется, по меньшей мере, приблизительно 20%-ное относительное ингибирование связывания до того, как антитело рассматривается как достаточно конкурентное. В случаях, когда эпитопы, принадлежащие конкурирующим антителам, в антигене расположены близко, конкуренция может быть отмечена более чем приблизительно 40%-ным ингибированием связывания CD38 (например, по меньшей мере приблизительно 45%-ным ингибированием, например по меньшей мере приблизительно 50%-ным ингибированием, например по меньшей мере приблизительно 55%-ным ингибированием, например по меньшей мере приблизительно 60%-ным ингибированием, например по меньшей мере приблизительно 65%-ным ингибированием, например, по меньшей мере примерно 70%-ное ингибирование, например, по меньшей мере приблизительно 75%-ным ингибированием, например, по меньшей мере приблизительно 80%-ным ингибированием, например, по меньшей мере приблизительно 85%-ным ингибированием, например, по меньшей мере приблизительно 90%-ным ингибированием, например, по меньшей мере приблизительно 95%-ным ингибированием или более высоким уровнем относительного ингибирования).

В некоторых случаях метятся один или более компонентов анализов конкурентного связывания, рассматриваемых ниже в контексте диагностических применений.

Также возможна конкуренция между антителами к CD38 в отношении более, чем одного из эпитопов CD38 и/или части CD38, например, в контексте, когда антитело-связывающие свойства конкретного региона CD38 удерживаются в его фрагментах, например, в случае хорошо представленного линейного эпитопа, расположенного в различных исследуемых фрагментах или конформационного эпитопа, представленного в достаточно больших фрагментах CD38, а также в CD38.

Оценка конкуренции, как правило, включает оценку относительного ингибирующего связывания с использованием антитела согласно настоящему изобретению, CD38 (либо человека, либо яванского макака, либо обоих), и исследуемой молекулы. Исследуемые молекулы могут включать любую молекулу, в том числе другие антитела, малые молекулы, пептиды и т.д. Соединения смешивают в количествах, достаточных для проведения сравнения, несущего информацию о селективности и/или специфичности молекул в продукте относительно других присутствующих молекул.

Количества исследуемого соединения, CD38 и антител согласно настоящему изобретению могут

варьировать. Например, для оценки наличия конкуренции методом ELISA требуется приблизительно 5-50 мкг (например, приблизительно 10-50 мкг, приблизительно 20-50 мкг, приблизительно 5-20 мкг, приблизительно 10-20 мкг и т.д.) антитела к CD38 и/или CD38-мишеней. Условия также должны быть пригодны для связывания. Как правило, физиологические или близкие к физиологическим условиям (например, температура приблизительно 20-40°C, pH приблизительно 7-8 и т.д.) являются подходящими для антитела к CD38:CD38 связывания.

Часто конкуренция отмечена значительно большим относительным ингибированием, чем приблизительно 5% по данным ELISA и/или FACS анализа. Желательным может быть установление более высокого предела относительного ингибирования как критерия/детерминанты того, что является подходящим уровнем конкуренции в конкретном контексте (например, где анализ конкуренции используется для отбора или скрининга новых антител, созданных с предполагаемой функцией блокирования связывания другого пептида или молекулы, связывающихся с CD38 (например, природными партнерами по связыванию CD38, такими как CD31, также называемый CD31 антиген, EndoCAM, GPIIb, PECAM-1, эндотелиальная молекула клеточной адгезии тромбоцитов или природным антителом к CD38).

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 согласно настоящему изобретению специфически связывается с одним или более остатками или областями в CD38, но также не вступает в перекрестную реакцию с другими белками с гомологией к CD38, например, BST-1 (антиген-1 стромы костного мозга) и Mo5, также называемый CD157.

Как правило, отсутствие перекрестной реактивности подразумевает менее, чем приблизительно 5%-ное относительное конкурентное ингибирование между молекулами при оценке методом ELISA и/или FACS анализа с использованием достаточного количества молекул при подходящих условиях анализа.

#### Ингибирование активности CD38

Описанные в настоящем изобретении антитела могут найти применение в блокировании взаимодействия лиганд-рецептор или ингибировании взаимодействия рецептор-компонент. Антитела к CD38 согласно настоящему изобретению могут быть "блокирующими" или "нейтрализующими". "Нейтрализующее антитело" предназначено для обозначения антитела, связывание которого с CD38 приводит к ингибированию биологической активности CD38, например, его способности взаимодействовать с лигандами, ферментативную активность, сигнальную активность и, в частности, его способность активировать лимфоциты. Ингибирование биологической активности CD38 возможно оценить при помощи одного или более стандартных анализов *in vitro* или *in vivo*, известных в данной области техники (см. примеры ниже).

"Ингибирует связывание" или "блокирует связывание" (например, когда речь идет о торможении/блокировании связывания CD38-партнера по связыванию с CD38) охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование.

Ингибирование/блокирование связывания CD38-партнера по связыванию с CD38 может снизить или изменить нормальный уровень или тип клеточного сигналинга, возникающего при связывании CD38-партнера по связыванию с CD38 без ингибирования или блокирования. Ингибирование и блокирование также включают любое измеряемое снижение аффинности связывания CD38-партнера по связыванию к CD38 при контакте с антителом к CD38 по сравнению с лигандом, не контактирующим с антителом к CD38, например, блокирования связывания CD38-партнера по связыванию с CD38, по меньшей мере, приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

Описанные антитела к CD38 могут также ингибировать рост клеток. "Ингибирует рост" включает любое измеряемое снижение роста клеток при контакте с антителом к CD38 по сравнению с ростом тех же клеток, не конкурирующих с антителом к CD38, например, ингибирование роста культуры клеток, по меньшей мере, приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения описанные антитела к CD38 способны истощать активированные лимфоциты и плазматические клетки. "Истощение" в контексте настоящего описания подразумевает измеряемое снижения сывороточных уровней (например, как исследовано на яванских макаках) активированных лимфоцитов и/или плазматических клеток по сравнению с нелечеными животными. В общем, наблюдается истощение, по меньшей мере, приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Как показано ниже в примерах, в дополнение к этому, особым преимуществом, характерным для антител согласно настоящему изобретению, является восстановление этих клеток после введения дозы, то есть как известно для некоторых процедур (например, с антителами к CD20), истощение клеток может продолжаться в течение длительного периода времени, что приводит к нежелательным побочным эффектам. Как показано в настоящем документе, функции активированных лимфоцитов и/или плазматических клеток являются восстанавливаемыми.

#### Способы получения антител согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы получения описываемых антител к CD38. Данные способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую антитела согласно настоящему изобретению. Как будет понятно специалистам в данной области техники, это может быть осуществлено различными способами, в зависимости от природы антитела. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, в случае, когда анти-



тела согласно настоящему изобретению являются общепринятыми полноразмерными антителами, например, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи в условиях, при которых продуцируется антитело, и оно может быть выделено.

В общем, предлагаются нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению. Такие полинуклеотиды кодируют как переменные, так и константные области каждой из тяжелых и легких цепей, хотя другие комбинации также рассматриваются в настоящем изобретении в соответствии с композициями, описанными в настоящем документе. Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты олигонуклеотидов, полученных из описанных полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот, комплементарных этим полинуклеотидам.

Полинуклеотиды могут быть в виде РНК или ДНК. В пределах объема настоящего изобретения находятся полинуклеотиды в виде ДНК, кДНК, геномной ДНК, аналогов нуклеиновых кислот и синтетические ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и в случае одноцепочечной может быть кодирующей (смысловой) цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, описанной в настоящем документе, или может быть отличной кодирующей последовательностью, чья последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода кодирует те же полипептиды, как и ДНК, описанная в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нуклеиновую кислоту(ты), кодирующую антитела согласно настоящему изобретению, вводят в экспрессионные векторы, которые могут быть внехромосомными или созданными для интеграции в геном клетки-хозяина, в которую он вводится.

Экспрессионные векторы могут содержать любое количество соответствующих регуляторных последовательностей (включая, но не ограничиваясь, последовательности контроля транскрипции и трансляции, промоторы, сайты связывания рибосом, энхансеры, сайты инициации репликации и т.д.) или других компонентов (выбор генов и т.д.) все из которых функционально связаны, как хорошо известно в данной области техники. В некоторых случаях используются две нуклеиновые кислоты, и каждая вводится в различный экспрессионный вектор (например, тяжелая цепь является первым экспрессионным вектором, легкая цепь является вторым экспрессионным вектором), или, альтернативно, они могут быть введены в один экспрессионный вектор. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что разработка экспрессионного вектора(ов), включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, уровень экспрессии желаемого белка и т.д.

Как правило, нуклеиновые кислоты и/или экспрессия могут быть введены в подходящую клетку-хозяина для создания рекомбинантной клетки-хозяина с использованием любого способа, подходящего для избранной клетки-хозяина (например, трансформация, трансфекция, электропорация, инфекция), таким образом, что молекула(ы) нуклеиновой кислоты функционально связана с одним или несколькими контролирующими экспрессию элементами (например, в векторе, в конструкции, созданной при помощи процессов в клетке, интегрированной в геном клетки-хозяина). Полученная рекомбинантная клетка-хозяин может содержаться в условиях, пригодных для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в подходящем животном, кроме человека, в подходящей культуральной среде с добавлением соответствующих солей, факторов роста, антибиотиков, пищевых добавок и т.п.), в результате чего продуцируется кодируемый полипептид(ы). В некоторых случаях тяжелые цепи продуцируются в одной клетке, а легкая цепь в другой.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, известны в данной области техники и включают многие бессмертные клеточные линии, доступные из American Type Culture Collection (ATCC), Манассас, Вирджиния, включают, но не ограничиваются клетками яичника китайского хомяка (CHO), HEK 293 клетками, NSO клетками, HeLa клетками, клетками почки детеныша хомяка (BHK), клетками почки обезьяны (COS), клетками гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и рядом других клеточных линий. Клетки, не являющиеся клетками млекопитающих, включают, но не ограничиваются бактерии, дрожжи, насекомых, растения также могут быть использованы для экспрессии рекомбинантных антител. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела могут быть получены в трансгенных животных, таких как коровы или куры.

Общие способы молекулярной биологии антитела, экспрессии, очистки и скрининга описаны, например, в работах *Antibody Engineering*, edited by Kontermann&Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 и 2010 *Hayhurst&Georgiou*, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; *Maynard&Georgiou*, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76; и *Morrison*, S. (1985) *Science* 229:1202.

#### Использование и показания

Созданные антитела согласно настоящему изобретению находят применение в различных областях, включая диагностику CD38-опосредованных заболеваний и их лечение.

#### CD38-опосредованные состояния

В одном из аспектов настоящее изобретение предлагает способы диагностики и лечения состояния, ассоциированного с воспалением и иммунными заболеваниями, в частности заболеваниями, ассоциированными с активированными лимфоцитами. Как показано в настоящем документе, CD38 экспрессируется в незрелых гемопоэтических клетках, ингибируется в зрелых клетках и повторно экспрессируется на

высоких уровнях в активированных лимфоцитах и плазматических клетках. Например, высокая экспрессия CD38 наблюдается на активированных В-клетках, плазматических клетках, активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных CD8<sup>+</sup> Т-клетках, НК-клетках, НКТ-клетках, зрелых дендритных клетках (ДК) и активированных моноцитах.

Терапевтические антитела к CD38 согласно настоящему изобретению связываются с CD38-положительными клетками, что приводит к истощению этих клеток, таких как активированные лимфоциты, через многочисленные механизмы действия, включая как CDC, так и ADCC пути.

Таким образом, любое аутоиммунное заболевание, демонстрирующее либо повышенную экспрессию CD38, либо повышенное число клеток, экспрессирующих CD38, как компонент заболевания, возможно лечить с использованием антител согласно настоящему изобретению. Эти заболевания включают, но не ограничиваются этим, аллогенное отторжение островкового трансплантата, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунное заболевание Аддисона, антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела (ANCA), аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную крапивницу, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, синдром Кастельмана, целиакию-спру-дерматит, синдром иммунной дисфункции хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, CREST синдром, болезнь Холодовых агглютининов, болезнь Крона, дерматомиозит, дискоидную красную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, недостаточность фактора VIII, фибромиалгию-фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, синдром Гудпасчера, реакцию трансплантат-против-хозяина (РТПХ), тиреоидит Хашимото, гемофилию А, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нейропатию, IgM-полинейропатию, иммуноопосредованную тромбоцитопению, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, плоский лишай, красную волчанку, болезнь Менъера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, миастению гравис, вульгарный пемфигус, пернициозную анемию, узелковый полиартрит, полихондрит, полигландулярный синдром, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, псориагический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, отторжение трансплантатов паренхиматозных органов, синдром скованного человека, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, язвенный колит, увеит, васкулиты, такие как дерматит, герпетиформный васкулит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

Конкретное использование в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела нашли в диагностике и/или лечении ряда заболеваний, включая, но не ограничиваясь аутоиммунные заболевания, включающие, но не ограничивающиеся, системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), язвенный колит и реакцию трансплантат-против-хозяина.

Например, могут быть отобраны пациенты с высоким содержанием плазматических клеток, например, пациенты с СКВ, имеющие высокий уровень плазматических клеток, а также пациенты с РА, которые выявились ареактивны к CD20 лекарственным препаратам.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способы лечения состояния, ассоциированного с пролиферацией клеток, экспрессирующих CD38, включающие введение пациенту фармацевтически эффективного количества описанного антитела. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения состоянием является рак и в конкретных вариантах воплощения настоящего изобретения рак является гематологическим раком. В других конкретных вариантах воплощения настоящего изобретения состоянием является множественная миелома, хронический лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, плазмоклеточный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, В-клеточная лимфома или лимфома Беркитта.

Как известно в данной области техники, некоторые состояния ассоциированы с клетками, экспрессирующими CD38, и некоторые состояния ассоциированы с гиперэкспрессией, экспрессией высокой плотности или активированной экспрессией CD38 на поверхности клеток. Экспрессирует ли популяция клеток CD38 или нет, возможно определить способами, известными в данной области техники, например, определение методом проточной цитометрии процента клеток в данной популяции, меченных антителом, специфически связывающимся с CD38 или иммуногистохимическими анализами, которые в общем описаны ниже для диагностического использования. Например, популяцию клеток, в которой экспрессия CD38 обнаруживается в 10-30% клеток, возможно рассматривать как имеющую слабую CD38 позитивность, а популяцию клеток, в которой экспрессия CD38 обнаруживается в более чем примерно 30% клеток, возможно рассматривать как определенную CD38 положительную (например, в работе Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356), хотя могут быть использованы другие критерии для определения того, экспрессирует ли популяция клеток CD38. Плотность экспрессии на поверхностях клеток может быть определена с использованием способов, известных в данной области техники, таких

как, например, измерение проточной цитометрией средней интенсивности флуоресценции клеток, которые были флуоресцентно мечены с использованием антител, специфически связывающихся с CD38.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения композиции и способы согласно настоящему изобретению используются при раке, таком как "гематологический рак", термин, относящийся к злокачественным новообразованиям кроветворных тканей и включающий в себя лейкоз, лимфому и множественную миелому. Неограничивающие примеры состояний, ассоциированных с экспрессией CD38, включают, но не ограничиваются множественной миеломой (Jackson et al. (1988), *Clin. Exp. Immunol.* 72: 351-356), В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) Durig et al. (2002), *Leukemia* 16: 30-5; Morabito et al. (2001), *Leukemia Research* 25: 927-32; Marinov et al. (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8; и Jelinek et al. (2001), *Br. J. Haematol.* 115: 854-61), острым лимфобластным лейкозом (Keyhani et al. (1999), *Leukemia Research* 24: 153-9; и Marinov et al. (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8), хроническим миелоидным лейкозом (Marinov et al. (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8), острым миелоидным лейкозом (Keyhani et al. (1999), *Leukemia Research* 24: 153-9), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), хроническим миелоидным лейкозом или хроническим миелолейкозом (ХМЛ), острым миелоидным лейкозом или острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), волосатоклеточным лейкозом (НСЛ), миелодиспластическими синдромами (МДС) или хроническим миелолейкозом (ХМЛ-БП) в бластном и всех подтипах этих лейкозов, которые определяются морфологическими, гистохимическими и иммунологическими методиками, хорошо известными специалистам в данной области техники.

"Неоплазия" или "неопластическое состояние" относится к состоянию, ассоциированному с пролиферацией клеток, характеризующемуся потерей нормальных контролей, что приводит к одному или более симптомам, в том числе, нерегулируемому росту, отсутствию дифференциации, локальной тканевой инвазии и метастазам.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения гематологический рак выбран из группы хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), хронического миелолейкоза (ХМЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ).

Кроме того, в данной области техники известно, что экспрессия CD38 является прогностическим показателем для пациентов с состояниями, такими как, например, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (Durig et al. (2002), *Leukemia* 16: 30-5; и Morabito et al. (2001), *Leukemia Research* 25: 927-32) и острый миелоидный лейкоз (Keyhani et al. (1999), *Leukemia Research* 24: 153-9).

ХЛЛ является наиболее распространенным лейкозом среди взрослого населения в западном мире. ХЛЛ вовлекает клональную экспансию псевдозрелых лимфоцитов с вовлечением лимфатических узлов и других лимфоидных тканей с прогрессирующей инфильтрацией костного мозга и присутствием в периферической крови. В-клеточная форма (В-ХЛЛ) присутствует практически во всех случаях.

#### В-ХЛЛ

В-ХЛЛ является неизлечимым заболеванием, характеризующимся постепенным увеличением энергичных моноклональных клеток В-линии, накапливающихся в костном мозге и периферической крови продолжительным образом на протяжении многих лет. Экспрессия CD38 рассматривается как независимый неблагоприятный прогностический фактор для В-ХЛЛ. Hamblin et al., *Blood* 99:1023-9 (2002).

Современная стандартная терапия В-ХЛЛ носит паллиативный характер и в основном осуществляется цитостатическими препаратами хлорамбуцилом или флударабином. При возникновении рецидивов часто проводится сочетанная терапия с использованием флударабина, циклофосамида в комбинации с ритуксимабом (моноклональное антитело к CD20) или кэмпасом (моноклональное антитело к CD52). Таким образом, существует критическая неудовлетворенная медицинская потребность в лечении В-ХЛЛ. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются способы лечения В-ХЛЛ с применением описанных антител к CD38 (и, как проведено ниже, это может быть реализовано при помощи комбинации лекарственных препаратов, включающих необязательно и независимо любое из вышеуказанных лекарственных средств).

В-ХЛЛ характеризуется двумя подтипами, хроническим и агрессивным. Эти клинические фенотипы коррелируют с наличием или отсутствием соматических мутаций в гене варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (IgVH). В контексте настоящего описания хронический В-ХЛЛ относится к нарушению у субъекта, имеющего мутировавший ген IgVH и/или репрезентирующего один или более клинических фенотипов, связанных с хроническим В-ХЛЛ. В контексте настоящего описания словосочетание агрессивный В-ХЛЛ относится к нарушению у субъекта, имеющего немутировавший IgVH и/или репрезентирующего один или более клинических фенотипов, ассоциированных с агрессивным В-ХЛЛ.

#### Множественная миелома

Множественная миелома является злокачественным нарушением клеток В-линии, характеризующимся опухолевой пролиферацией плазматических клеток в костном мозге. Современные схемы лечения демонстрируют умеренные частоты ответа. Однако наблюдаются лишь незначительные изменения в общей выживаемости, и средняя выживаемость составляет около 3 лет. Таким образом, существует критическая неудовлетворенная медицинская потребность в лечении множественной миеломы. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются способы лечения множественной миеломы, используя антитела, раскрытые в настоящем изобретении.

CD38 экспрессируется на высоком уровне на плазматических клетках, которые являются терминально дифференцированными В-клетками.

Пролиферация миеломных клеток вызывает различные эффекты, в том числе литические поражения (дыры) в кости, сниженное количество эритроцитов, продуцирование аномальных белков (с сопутствующим повреждением почек, нервов и других органов), сниженную функцию иммунной системы и повышенные уровни кальция в крови (гиперкальциемия).

Современные варианты лечения включают химиотерапию, предпочтительно ассоциированную, когда это возможно, с аутологичной трансплантацией стволовых клеток (АТСК).

#### Моноклональная гаммапатия неустановленной этиологии и вялотекущая множественная миелома

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются способы лечения моноклональной гаммапатии с использованием описанных антител. В других вариантах воплощения настоящего изобретения предлагаются способы лечения вялотекущей множественной миеломы с использованием описанных антител.

Моноклональная гаммапатия неустановленной этиологии (МГНЭ) и вялотекущая множественная миелома (SMM) являются бессимптомными, предраковыми нарушениями, характеризующимися пролиферацией моноклональных плазматических клеток в костном мозге и отсутствием поражения органов-мишеней.

Вялотекущая множественная миелома (SMM) является бессимптомным нарушением пролиферации плазматических клеток с высоким риском прогрессирования в симптоматическую или активную множественную миелому (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)).

Международные единые критерии, определяющие SMM, были приняты в 2003 году и предусматривают уровень М-белка у пациента >30 г/л и/или клональных плазматических клеток костного мозга >10% (Br. J. Haematol 121: 749-57 (2003)). У пациента не должны наблюдаться органная или тканевая недостаточность, включая костные поражения или симптомы (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

Последние исследования выявили два подкласса SMM:

- i) пациенты с прогрессирующим заболеванием и
- ii) пациенты с непрогрессирующим заболеванием (Br. J. Haematol. 121:631-636 (2003)).

Международные единые критерии, определяющие МГНЭ, предусматривают уровень М-белка у пациента >30 г/л, плазматических клеток костного мозга <10% и отсутствие органной или тканевой недостаточности, включая костные поражения или симптомы (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

SMM напоминает моноклональную гаммапатию неустановленной этиологии (МГНЭ) при отсутствии поражения органов-мишеней (N. Engl J. Med 356 (25): 2582-2590 (2007)). Клинически, однако, SMM намного более вероятно прогрессирует в активную множественную миелому или амилоидоз через 20 лет (78% вероятности для SMM против 21% для МГНЭ) (N. Engl J. Med 356 (25): 2582-2590 (2007)).

#### Композиции антител для введения in vivo

Лекарственные формы антител, используемые в соответствии с настоящим изобретением, изготавливают для хранения путем смешиванием антитела, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. [1980]) в виде лиофилизированных лекарственных форм или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (приблизительно менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Лекарственная форма, описанная в настоящем документе, может также содержать более, чем одно активное соединение, что является необходимым для конкретного показания, нуждающегося в лечении, предпочтительно с комплементарными активностями, которые не оказывают отрицательного воздействия друг друга. Например, желательным может быть предложить антитела с другими свойствами. Альтернативно или дополнительно, композиция может содержать цитотоксическое средство, цитокин, ингибирующее рост средство и/или низкомолекулярный антагонист. Соответственно такие молекулы присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предназначенной цели.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные

или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980).

Лекарственные формы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными или практически стерильными. Это легко достигается фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

Могут быть изготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антигено, чьи матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент U.S. № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма. этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DE-ROT<sup>TM</sup> (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как такие полимеры, как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота способны высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

Когда инкапсулированные антигены остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если механизм агрегации обусловлен межмолекулярным образованием S-S-связи через тиодисульфидный обмен, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислых растворов, регулированием содержания влаги, использованием соответствующих добавок и разработкой специфических полимерных матричных композиций.

#### Способы введения

Антигены и химиотерапевтические агенты согласно настоящему изобретению вводят субъекту в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болуса или путем непрерывной инфузии в течение времени, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацеребральным, подкожным, интраартикулярным, внутрисуставным, интраосальным, пероральным, местным или ингаляционным путями. Предпочтительным является внутривенное или подкожное введение антигена.

#### Способы лечения

В способах согласно настоящему изобретению терапия используется для обеспечения положительного терапевтического ответа в отношении заболевания или состояния. Под "положительным терапевтическим ответом" подразумевается улучшение заболевания или состояния и/или улучшение симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием. Например, положительный терапевтический ответ будет относиться к одному или более из следующих улучшений заболевания:

- (1) снижение количества опухолевых клеток,
- (2) увеличение смерти опухолевых клеток,
- (3) ингибирование выживаемости опухолевых клеток,
- (5) ингибирование (то есть замедление до некоторой степени, предпочтительно прекращение) роста опухоли;
- (6) увеличенная частота выживаемости пациентов и
- (7) некоторое облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

Положительные терапевтические ответы при любом заболевании или состоянии могут быть определены путем стандартизованных критериев ответа, специфических для данного заболевания или состояния. Опухолевый ответ может быть оценен изменениями в морфологии опухоли (т.е. общая опухолевая масса, размер опухоли и тому подобное) с использованием скрининговых методик, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгеновская рентгенография, компьютерная томография (КТ), визуализация остеосцинтиграфии, эндоскопия и биопсия образца опухоли, включая аспирацию костного мозга (ВМА) и подсчет опухолевых клеток в кровотоке.

В дополнение к этим положительным терапевтическим ответам, субъект, получающий терапию, может наблюдать положительный эффект улучшения симптомов, ассоциированных с заболеванием.

Таким образом, при В-клеточных опухолях субъект может испытывать снижение так называемых В-симптомов, т.е. ночной потливости, лихорадки, потери веса и/или крапивницы. Для предраковых состояний терапия лекарственным средством с антигеном к CD38 может блокировать и/или пролонгировать время развития злокачественного состояния, например, развитие множественной миеломы у субъектов, страдающих моноклональной гаммапатией неустановленной этиологии (МГНЭ).

Улучшение заболевания возможно охарактеризовать как полный ответ. Под "полным ответом" подразумевается отсутствие клинически обнаруживаемого заболевания с нормализацией любых ранее аномальных рентгенографических исследований, костного мозга и спинномозговой жидкости (СМЖ) или

анормального моноклонального белка в случае миеломы.

Такой ответ может сохраняться в течение по меньшей мере от 4 до 8 недель, а иногда от 6 до 8 недель после лечения в соответствии со способами настоящего изобретения. Кроме того, улучшение заболевания может быть классифицировано как частичный ответ. Под "частичным ответом" подразумевается, по меньшей мере, примерно 50%-ное снижение всей измеримой опухолевой массы (т.е. количества злокачественных клеток, присутствующих у субъекта, или измеренной суммарной массы опухоли или количества аномального моноклонального белка) при отсутствии новых повреждений, которые могут сохраняться в течение от 4 до 8 недель, или от 6 до 8 недель.

Лечение в соответствии с настоящим изобретением включает "терапевтически эффективное количество" используемых лекарственных средств. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата.

Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума и способности лекарственных средств вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество является также таким, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

"Терапевтически эффективное количество" для лечения опухоли возможно также измерить его способностью стабилизировать прогрессирование болезни. Способность соединения ингибировать рак может быть оценена в системе животной модели, прогностичной для эффективности при опухолях человека.

Альтернативно данное свойство композиции может быть оценено путем исследования способности соединения ингибировать рост клеток или индуцировать апоптоз в анализах *in vitro*, известных специалисту в данной области техники. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли или иным образом устранять симптомы у субъекта. Специалист в данной области техники сможет определить эти количества на основе таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов субъекта и конкретная композиция или избранный путь введения.

Схемы приема лекарственных средств корректируются для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, несколько раздельных доз могут быть введены в течение периода времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, что диктуется потребностями терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть изготовлены в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма в контексте настоящего описания относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению, и каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

Особенности лекарственных форм согласно настоящему изобретению продиктованы и непосредственно зависят от

(а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который необходимо достичь, и

(б) ограничений, присущих в области приготовления такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Эффективные дозы и схемы приема антител к CD38, используемые в настоящем изобретении, зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области техники.

Неограничивающий пример диапазона терапевтически эффективного количества антитела к CD38, используемого в настоящем изобретении, составляет приблизительно 0,1-100 мг/кг, например, приблизительно 0,1-50 мг/кг, например, приблизительно 0,1-20 мг/кг, например, приблизительно 0,1-10 мг/кг, например, приблизительно 0,5, приблизительно 0,3, приблизительно 1 или 3 мг/кг. В другом варианте воплощения настоящего изобретения антитело вводят в дозе 1 мг/кг или более, например, в дозе от 1 до 20 мг/кг, например, доза от 5 до 20 мг/кг, например, доза 8 мг/кг.

Средний медицинский специалист в данной области техники может легко определить и прописать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз лекарственного средства, используемых в фармацевтической композиции в количестве меньшем, чем это требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят путем инфузии в еженедельной дозе от 10 до 500 мг/кг, например, от 200 до 400 мг/кг. Такое введение может быть повторено, например, от 1 до 8 раз, например, от 3 до 5 раз. Введение может быть осуществлено путем непрерывной инфузии в течение от 2 до 24 ч, например, от 2 до 12 ч.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят медленной непрерывной инфузией в течение длительного времени, например, более 24 ч, если это необходимо для уменьшения побочных эффектов, включая токсичность.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят в еженедельной дозе от 250 до 2000 мг, например 300, 500, 700, 1000, 1500 или 2000 мг до 8 раз, например от 4 до 6 раз. Введение может быть осуществлено путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. Такая схема может быть повторена один или более раз по мере необходимости, например, после 6 месяцев или 12 месяцев. Дозировка может быть определена или скорректирована путем измерения количества соединения согласно настоящему изобретению в крови после введения, например, путем отбора биологического образца и использованием антиидиотипических антител, которые воздействуют на область связывания антигена антителом к CD38.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят один раз в неделю в течение от 2 до 12 недель, например от 3 до 10 недель, например от 4 до 8 недель.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело к CD38 вводят согласно схеме, включающей одну инфузию антитела к CD38 антитела с последующим введением антитела к CD38, конъюгированным с радиоактивным изотопом. Схема может быть повторена, например, через 7-9 дней.

В качестве неограничивающих примеров, лечение в соответствии с настоящим изобретением может проводиться в виде суточной дозы антитела в количестве приблизительно 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 день, по меньшей мере, на один из дней 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, на одной 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 любой их комбинации, используя одну или разделенные дозы каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения молекула антитела к CD38 согласно настоящему изобретению используется в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, химиотерапевтическим средством. Неограничивающие примеры ДНК-повреждающих химиотерапевтических средств включают ингибиторы топоизомеразы I (например, ириротекан, топотекан, камптотecin и аналоги или их метаболиты и доксорубин), ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, тенипозид и даунорубин), алкилирующие агенты (например, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, тиотепа, ифосфамид, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, декарбазин, метотрексат, митомицин С и циклофосфамид); интеркаляторы ДНК (например, цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин); интеркаляторы ДНК и генераторы свободных радикалов, такие как блеомицин и миметики нуклеозидов (например, 5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин, флударабин, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и гидроксимочевина).

Химиотерапевтические средства, которые нарушают репликацию клеток, включают: паклитаксел, доцетаксел и аналоги; винкристин, винбластин и аналоги; талидомид, леналидомид и родственные аналоги (например, СС-5013 и СС-4047); ингибиторы протеинтирозинкиназы (например, иматиниб мезилат и gefitinib), ингибиторы протеасом (например, бортезомиб), NF-κB-ингибиторы, включая ингибиторы IκB-киназы; антитела, связывающиеся с белками, сверхэкспрессируемыми при раке и тем самым подавляющие репликацию клеток (например, трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб и бевацизумаб), а также другие ингибиторы белков или ферментов, которые активируются, сверхэкспрессируются или активированы при раке, ингибирование которых подавляет репликацию клеток.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению могут быть использованы до, одновременно с или после лечения Velcade® (бортезомиб).

#### Использование в диагностических целях

Предлагаемые антитела к CD38 также находят применение *in vitro* или *in vivo* визуализации опухолей или аутоиммунных заболеваний, ассоциированных с CD38. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела, описанные в настоящем документе, используются как для диагностики и для лечения, или только для диагностики. Когда антитела к CD38 используются как для диагностики, так и для лечения, некоторые варианты воплощения настоящего изобретения основываются на двух различных антителах к CD38 с двумя различными эпитопами, таким образом, что диагностическое антитело не конкурирует за связывание с терапевтическим антителом, хотя в некоторых случаях одно антитело может быть использовано для обеих целей. Например, в некоторых случаях, Ab19 антитело используется диагностически (как правило, меченное, как рассматривается ниже), а Ab79 используется терапевтически или наоборот. Таким образом, включенными в изобретение являются композиции, содержащие диагностическое антитело и терапевтическое антитело, а в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения диагностическое антитело мечено, как описано в настоящем документе. В дополнение к этому, композиция терапевтических и диагностических антител также может быть совместно введена с другими лекарственными средствами, приведенными в настоящем документе.

Во многих вариантах воплощения настоящего изобретения диагностическое антитело мечено. Под "меченым" в настоящем документе подразумевается то, что антитела, описанные в настоящем докумен-

те, имеют один или более элементов, изотопов или химических соединений, присоединенных для возможности выявления во время скрининга или диагностической процедуры. Как правило, метки делятся на несколько классов:

а) иммунные метки, которые могут быть эпитопом, включенным как сливающиеся клетки, которые распознаются антителом,

б) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами,

в) низкомолекулярные метки, которые могут включать люминесцентные и колориметрические красители, или молекулы, такие как биотин, который дает возможность осуществлять другие способы мечения, и

г) метки, такие как частицы (включая пузырьки для ультразвукового мечения) или парамагнитные метки, которые позволяют визуализацию тела.

Метки могут быть введены в антитело в любом положении и могут быть введены *in vitro* или *in vivo* во время экспрессии белка, как известно в данной области техники.

Диагноз может быть поставлен либо *in vivo*, путем введения диагностического антитела, которое позволяет визуализацию всего тела, как описано ниже, либо *in vitro* на образцах, отобранных у пациента. "Образец" в контексте настоящего описания включает любое количество материалов, включая, но не ограничиваясь этим, жидкости тела (включая, но не ограничиваясь, кровь, мочу, сыворотку, лимфу, слюну, анальные и вагинальные выделения, пот и сперму), а также образцы тканей, полученные биопсией соответствующих тканей.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения проводится *in vivo* визуализация, включая, но не ограничиваясь, ультразвуком, КТ-сканированием, рентгеновским исследованием, МРТ- и ПЭТ-сканированием, а также оптическими методиками, например, с использованием оптических меток для опухолей у поверхности тела.

*In vivo* визуализация заболеваний, ассоциированных с CD38, может быть проведена любым подходящим способом. Например, для мечения антител к CD38 может быть использовано <sup>99m</sup>Tc-мечение или мечение с другим β-излучающим изотопом. Варианты данной методики могут включать использование магнитно-резонансной томографии (МРТ) для улучшения визуализации на основе методики гамма-камеры. Подобные способы и принципы иммуноскинтиграфии описаны, например, в работах Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), и Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", в *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al. (eds.) (Chapman&Hall 1993).

В одном варианте воплощения настоящее изобретение предлагает способ *in vivo* визуализации, в котором антитело к CD38 конъюгируют с агентом, промотирующим детектирование, конъюгированное антитело вводится хозяину, например, путем инъекции в кровоток и анализируется присутствие и локализация меченого антитела в хозяине. При помощи данного метода и любого другого диагностического способа, предложенного в настоящем документе, настоящее изобретение предлагает способ скрининга присутствия клеток, связанных с заболеванием, у пациента-человека или биологического образца, взятого у пациента-человека.

Для диагностической визуализации радиоизотопы могут быть связаны с антителом к CD38, либо непосредственно, либо опосредованно при помощи промежуточной функциональной группы. Полезные промежуточные функциональные группы включают хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота и диэтилентриаминпентауксусная кислота (см., например, патент US № 5057313). В таких диагностических тестах с участием антител к CD38, конъюгированных с радиоизотопом, доза конъюгированного антитела к CD38, доставленная пациенту, как правило, поддерживается на более возможном низком уровне за счет выбора изотопа с лучшим сочетанием минимального периода полураспада, минимальной задержки в организме и минимального количества изотопа, которое позволит обнаружение и точное измерение.

В дополнение к радиоизотопам и рентгеноконтрастным веществам, диагностические способы могут быть выполнены с использованием антител к CD38, конъюгированных с красителями (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастными средствами, флуоресцентными соединениями или молекулами и усиливающими агентами (например, парамагнитные ионы) для магнитно-резонансной томографии (МРТ) (см., например, патент US № 6331175, в котором описаны методики МРТ и подготовка антител, конъюгированных с МРТ-усиливающим агентом). Такие диагностические/детектирующие средства могут быть выбраны из средств для использования в магнитно-резонансной томографии и флуоресцентных соединений.

Для введения в антитело к CD38 радиоактивных металлов или парамагнитных ионов необходимой может быть его реакция с реагентом, имеющим длинный хвост, к которому прикреплены множество хелатирующих групп для связывания ионов. Таким хвостом может быть полимер, такой как полилизин, полисахарид или другие производные или цепь, способная к дериватизации, имеющая боковые группы, к которым могут быть присоединены хелатирующие группы, такие как, например, порфирины, полиамины, краун-эфиры, бистиосемикарбазоны, полиоксимы и подобные группы, полезные для данной цели.



Хелаты могут быть соединены с антителами к CD38 с использованием стандартных химических способов. Хелат, как правило, связывается с антителом к CD38 группой, позволяющей образование связи с молекулой с минимальной потерей иммунореактивности и минимальной агрегацией и/или внутренним перекрестным сшиванием.

Примеры потенциально полезных металл-хелатных комбинаций включают 2-бензил-ДТПА и ее монометилловый и циклогексилловый аналоги, используемые с диагностическими изотопами в общем энергетическом диапазоне от 60 до 4000 кэВ, например,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{76}\text{Br}$  для радиовизуализации.

Метки включают радионуклид, радиологическое контрастное вещество, парамагнитный ион, металл, флуоресцентную метку, хемилюминесцентную метку, ультразвуковое контрастное вещество и светочувствительное вещество. Такие диагностические вещества хорошо известны и любые такие известные диагностические средства могут быть использованы. Неограничивающие примеры диагностических средств включают радионуклиды, такие как

$^{110}\text{In}$ ,

$^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  
 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{154-158}\text{Gd}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  
 $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{51}\text{Mn}$ ,  $^{52\text{m}}\text{Mn}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{82\text{m}}\text{Rb}$ ,  $^{83}\text{Sr}$

или другие  $\gamma$ -,  $\beta$ - или позитрон-излучатели.

Используемые парамагнитные ионы могут включать хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), неодим (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III) или эрбий (III). Металлконтрастные средства могут включать лантан (III), золото (III), свинец (II) или висмут (III).

Ультразвуковые контрастные вещества могут содержать липосомы, такие как липосомы, заполненные газом.

Рентгеноконтрастные диагностические вещества могут быть избраны из соединений, соединений бария, соединений галлия и соединений таллия.

Эти и подобные хелаты при образовании комплекса с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, могут быть использованы для диагностических способов при помощи МРТ в связи с антителами к CD38. Макроциклические хелаты, такие как NOTA, DOTA и TETA, пригодны для использования с различными металлами и радиоактивными металлами, в частности с радионуклидами галлия, иттрия и меди, соответственно. Такие металл-хелатные комплексы могут быть созданы весьма стабильными путем адаптации размера кольца с металлом, представляющим интерес. Другие хелаты кольцевого типа, такие как макроциклические полиэфиры, представляющие интерес для стабильного связывания радионуклидов, таких как  $^{223}\text{Ra}$ , также могут быть пригодными в диагностических способах.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает диагностические конъюгаты антитела к CD38, в котором конъюгат антитела к CD38 конъюгирован с контрастным веществом (например, для магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии или с усиливающим ультразвук контрастным веществом) или радионуклидом, который может быть, например,  $\gamma$ -,  $\beta$ -, 2-, Оже-электрон- или позитрон-излучающим изотопом.

Антитела к CD38 также могут быть полезны, например, в обнаружении экспрессии антигена, представляющего интерес, в специфических клетках, тканях или сыворотке. Для диагностических целей антитело обычно мечется детектируемым остатком молекулы для анализов *in vitro*. Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует множество подходящих меток для использования в тестировании *in vitro*. Подходящие красители для использования в данном аспекте настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются, флуоресцентные лантанидные комплексы, в том числе европия и тербия, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метил-кумарин, квантовые точки (также называемые "нанокристаллы", см. US сер. № 09/315584, включенная в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки), пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люцифер желтый, Cascade Blue. ТМ., тexasский красный, цианиновые красители (C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 5, и т.д.), красители Alexa (включая Alexa, фикоэритрин, BODIPY и другие, описанные в 6<sup>th</sup> Edition of the Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland, работа включена в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки).

Окрашенные ткани могут быть оценены измерением радиоактивности в качестве показателя количества CD38-пептидов, ассоциированных с опухолью. Изображения, полученные с использованием таких методик, могут быть использованы для оценки биораспределения CD38 у пациента, млекопитающего или ткани, например, в контексте использования CD38 в качестве биомаркера присутствия инвазивных раковых клеток.

#### Изделия

В других вариантах воплощения настоящего изобретения предлагается изделие, содержащее материалы, используемые для лечения нарушений, описанных выше. Изделие содержит контейнер и этикет-

ку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик.

Контейнер содержит композицию, эффективную для лечения состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Активным агентом композиции является антитело. Этикетка на или связанная с контейнером, указывает, что композиция используется для лечения избранного состояния. Изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие вещества, предпочтительные с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкциями по применению.

#### Примеры

Следующие примеры приводятся для иллюстрации, но не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1. Создание экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотиды, кодирующие CD38 человека, яванского макака и мыши.

Для создания вектора, экспрессирующего CD38 человека (huCD38) из кДНК, полученной от Origene Technologies Trueclone® человека, был выделен полинуклеотид, кодирующий huCD38. Выделенный huCD38 был клонирован в стабильный экспрессионный вектор (ХОМА, Inc), содержащий ген устойчивости к неомицину (neo<sup>R</sup>), который позволил отобрать G418 (генетицин)-устойчивые трансфектанты. HuCD38 ген, присутствующий в отобранных трансфектантах, секвенировали для идентификации любых ошибок последовательности. Ошибки в последовательности, отклонявшиеся от идентификационного номера по GenBank, NM\_001775, были исправлены при помощи сайт-направленного мутагенеза с использованием ПЦР. Конечная векторная ДНК была подтверждена 5'-секвенированием.

Для создания вектора, экспрессирующего CD38 яванского макака (суCD38) из ДНК, полученной из кДНК здоровой ткани селезенки яванского макака, полученной из Biochain Institute, был выделен полинуклеотид, кодирующий суCD38.

Выделенный суCD38 был клонирован в стабильный экспрессионный вектор (ХОМА, Inc), содержащий ген neo<sup>R</sup>, который позволил отобрать G418 (генетицин)-устойчивые трансфектанты. суCD38 ген, присутствующий в отобранных трансфектантах, секвенировали для идентификации любых ошибок последовательности. Ошибки в последовательности, отклонявшиеся от идентификационного номера по GenBank, AY555148, были исправлены при помощи направленного мутагенеза с использованием ПЦР. Конечная векторная ДНК была подтверждена секвенированием.

Для создания вектора, экспрессирующего CD38 мыши (moCD38) из ДНК, полученной из Origene's TrueORF collection, был выделен полинуклеотид, кодирующий moCD38. Выделенный moCD38 был клонирован в стабильный экспрессионный вектор (ХОМА, Inc), содержащий ген neo<sup>R</sup>, который позволил отобрать G418 (генетицин)-устойчивые трансфектанты. moCD38 ген, присутствующий в отобранных трансфектантах, секвенировали для идентификации любых ошибок последовательности. Ошибки в последовательности, отклонявшиеся от идентификационного номера по GenBank, NM\_007646, были исправлены при помощи направленного мутагенеза с использованием ПЦР. Конечная векторная ДНК была подтверждена секвенированием.

Пример 2. Создание СО38-экспрессирующих клеток яичника китайского хомяка (СНО).

Для создания СНО клеток, экспрессирующих huCD38, muCD38 и суCD38, СНО клетки трансфицировали линеаризованной ДНК. После селекции в течение одной недели клетки сортировали при помощи проточной цитометрии и клетки, экспрессирующие наибольшее количество huCD38, muCD38 или суCD38 (наивысшее значение 15%), вносили в 96-луночные планшеты для получения отдельных колоний. Остальные клетки также высевались при селекции для формирования резервных колоний. Приблизительно через 12-14 дней после посева были идентифицированы отдельные колонии и перенесены в 96-луночные планшеты с глубокими лунками. После второго пассажа проводили скрининг клонов при помощи FACS анализа. Клоны с наибольшим уровнем продуцирования пересеивались и выращивались во встряхиваемых колбах. Наилучшие 2 клон были заморожены и/или культивировались для микоплазменного АВА тестирования и для увеличения размера.

Для создания репортера люциферазы для моделей диссеминированного ксенотрансплантата, коммерческий вектор, содержащий промотор CMV/ген люциферазы/неомицин селективируемый маркер (Promega, Madison, WI) использовали для получения стабильной трансфицированной линии в Daudi клетках лимфомы Беркитта.

Пример 3. Библиотеки фагового дисплея и скрининг агентов, связывающих CD38.

Выбор специфических антител-мишеней из библиотеки фагового дисплея был проведен в соответствии со способами, описанными в работе Marks et al. (2004, Methods Mol. Biol. 248:161-76). Вкратце, библиотеку фагового дисплея инкубировали с 100 пмоль биотинилированного CD38 при комнатной температуре в течение 1 ч, и полученный комплекс был поглощен 100 мкл суспензией гранул стрептавидина (DYNABEADS® M-280 Streptavidin, Invitrogen). Неспецифические фаги были удалены промывкой гра-

нул промывочным буфером (5% молока в PBS). Связанные фаги элюировали 0,5 мл 100 нМ триэтиламина (TEA) и немедленно нейтрализовали добавлением равного объема 1 М TRIS-Cl, pH 7,4. Элюированный пул фагов был использован для инфицирования TG1 клеток *E. coli*, растущих в логарифмической фазе и фагемид был высвобожден, как описано в Marks et al., Id. Отбор был повторен в общей сложности в три цикла.

Альтернативно библиотеки фагового дисплея были отсортированы по отношению к иммобилизованному CD38 (R&D Systems) для определения панели фрагментов антител, способных связывать CD38. Сортировка проводилась с использованием стандартных протоколов (см., например, *Methods in Molecular Biology*, vol. 178: *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* Edited by: P.M. O'Brien and R. Aitken, Humana Press; "Panning of Antibody Phage-Display Libraries," Coomber, D.W.J., pp. 133-145, и "Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens," Chames et al., pp. 147-157). Вкратце, три лунки планшета NUNC® MaxiSorp покрывали 50 мкл рекомбинантного CD38 (R&D Systems) в концентрации 10 мкг/мл в PBS. После инкубации в течение ночи при 4°C, свободные сайты связывания были блокированы 5% молоком в PBS в течение одного часа при комнатной температуре. Приблизительно 200 мкл фаговой библиотеки в 5% молоке/PBS затем было добавлено в блокированные лунки и инкубировано при комнатной температуре в течение примерно одного-двух часов. Лунки промывали и связанный фаг элюировали с использованием стандартных способов (см., например, Sambrook and Russell, *Molecule Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Элюированный фаг был амплифицирован путем заражения TG1 клеток-хозяев *E. coli* в логарифмической фазе роста. Инфицированные TG1 клетки были восстановлены центрифугированием при 2500 PRM в течение пяти минут, высеваны на 15 см 2YT-ампициллин-2% глюкоза агаровые планшеты и инкубированы при 30°C в течение ночи. Процесс сортировки затем был повторен с использованием амплифицированного фага. Цикл сортировки, элюирования и амплификации был повторен трижды.

После завершения сортировки, для инокуляции среды в 96-луночных планшетах использовали отдельные колонии высеянных TG1 клеток. Микрокультуры выращивали до  $OD_{600}=0,6$ , после чего экспрессию растворимого scFv индуцировали добавлением 1 mM IPTG и инкубацией в течение ночи во встряхивателе при 30°C. Бактерии осаждали центрифугированием и периплазматический экстракт был использован для тестирования связывания scFv с иммобилизованным CD38 при помощи стандартного анализа ELISA и FACS анализа связывания.

В FACS-скрининге связывания использовались CHO клетки, стабильно экспрессирующие CD38 для скрининга scFvs в периплазматическом экстракте (PPE) на способность связывать нативный, мембраносвязанный CD38. Исходные и CHO трансфектанты (клеточные линии, экспрессирующие CD38 человека или CD38 яванского макака, или CD38 мыши) ресуспендировали по отдельности при концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в PBS (Life Technologies), 0,5% BSA (Sigma Aldrich) и 0,1%  $NaN_3$  (Sigma-Aldrich) (FACS буфер). Исходные CHO клетки, которые не экспрессировали CD38, были использованы как отрицательный контроль. Аликвоты по двадцать пять мкл клеток высевали в 96-луночные планшеты с V-образным дном (Costar Cat # 3897) и к клеткам было добавлено 25 мкл периплазматического экстракта, содержащего Мус-меченый scFv-фрагмент антитела, затем смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки промывали дважды, после чего осадок ресуспендировали в 25 мкл мышинового антитела к с-тус (1/1000 в FACS буфере) (Roche) и снова инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в 25 мкл разведенного 1/200 антитела мыши к IgG-PE в FACS буфере (Jackson Labs), и снова инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали для удаления избытка несвязанного антитела и ресуспендировали в 70 мкл FACS буфера и анализировали на приборе BD FACScan®. Полученные данные оценивали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Inc.) Положительные образцы были определены путем сравнения средней интенсивности флуоресценции CD38-трансфицированных CHO клеток по отношению к средней интенсивности флуоресценции исходной CHO линии клеток (CD38<sup>-</sup>).

Клоны антитела, связывающие CD38 человека, секвенировали для идентификации уникальных клонов. Уникальные клоны scFv были классифицированы на основе скоростей диссоциации, определенных анализом Biacore®. От 200RU до 500RU рекомбинантного CD38 человека (R&D Systems cat # 2404-AC или эквивалент) были иммобилизованы стандартной реакцией аминного сочетания (Biacore®) на CM5 или эквивалентном чипе. Также была получена референтная точка, которую активировали и затем блокировали без иммобилизации белка. Это было осуществлено путем разбавления антигена с 1-3 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 5,0 и введением на активированную поверхность до достижения иммобилизации требуемого уровня 3-5 мин. Поверхность затем блокировали этаноламином. Периплазматические экстракты разбавляли один-к-одному аналитическим подвижным буфером 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и 0,05% полисорбата 20 при pH 7,4, с 2 мг/мл BSA (бычий сывороточный альбумин)). Разбавленный периплазматический экстракт вносили на поверхности поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на 30 мин в течение 300 с с дополнительными 900 с контролируемого времени диссоциации. Регенерация была проведена единичной 8-секундной инъекцией 100 mM HCl. Данные эталонные точки вычитали из данных активной поверхности, затем кривые диссо-

циации были построены с использованием модели диссоциации 1:1 в программном обеспечении Biacore® T100.

Наивысшие по ранжированию scFv клоны были преобразованы в IgG1 антитела. FACS-скрининг связывания был повторен на реформатированных клонах IgG1 с использованием исходных CHO клеток и CHO клеток, экспрессирующих CD38 человека, мыши и яванского макака, чтобы удостовериться в сохранении связывающих свойств, а также для оценки видовой перекрестной реактивности. FACS характеристика IgG-реформатированных клонов была проведена, как описано выше, но шаги, состоящие из добавления антитела к с-тус и антитела мыши к IgG-PE, были заменены на один шаг, в котором связывание полноразмерного IgG человека было обнаружено путем добавления фикоэритрин-конъюгированного антитела к IgG человека (Jackson Labs).

Пример 4. *In vitro* клеточные анализы переформатированных клонов IgG.

Около 150 клонов были переформатированы как IgG1 антитела человека и пять (Ab19, Ab43, Ab72, Ab79 и Ab110) были всесторонне исследованы с использованием панели анализов, как описано ниже. Свойства реформатированных IgG-клонов как *in vitro*, так и *in vivo* тестах сравнивали с двумя антителами, BMTK4-1 (также называемый Тест-1, ВМ-1, или BMTK-1) (SEQ ID NO: 24 и 25; переменные области тяжелой и легкой цепи) и BMTK4-2 (также называемый Тест-2, ВМ-2 или BMTK-2) (SEQ ID NO: 26 и 27; переменные области тяжелой и легкой цепи), аминокислотные последовательности которых были получены из последовательностей известных антител к CD38 даратумумаб (также называемых HuMax-CD38, описанные в международной публикации № WO 06/099875) и SAR650984 (описанный в международной публикации № WO 08/047242) соответственно. Паливизумаб (SYNAGIS®) (MedImmune), клинически утвержденное антитело, распознающее респираторно-синцитиальный вирус, служило отрицательным контролем для связывания CD38.

Пример 5. Обнаружение связывания Ab79 иммунофлуоресценцией.

Ab79, меченное красителем Alexa Fluor®-488, наносили на замороженные срезы нормальной ткани толстой кишки человека, предстательной железы и лимфатических узлов. Паливизумаб (Synagis®), меченный красителем Alexa Fluor®-488, служил отрицательным контролем окрашивания. Полученные иммунофлуоресцентные изображения приведены на фиг. 4. Окрашивание, наблюдаемое для Ab79, было идентично окрашиванию, наблюдаемому для коммерчески доступного поликлонального антитела к CD38 на здоровой ткани толстой кишки человека, предстательной железы и лимфатических узлов (данные не приведены).

Ab79, меченное красителем Alexa Fluor®-488, также наносили на образцы здорового костного мозга и костного мозга с множественной миеломой (данные не приведены). В то время как Ab79 связывает ~10% клеток здорового костного мозга, >90% клеток костного мозга с множественной миеломой, в 4 из 4 исследованных образцов, продемонстрировали связывание Ab79.

Также была исследована способность Ab79 связываться с некоторым количеством клеточных линий (MOLP-8, DAUDI, RPM1 и MCF7). MOLP-8 (множественная миелома человека), DAUDI (лимфобласты, полученные от пациента с лимфомой Беркитта) и RPM1 (клеточная линия, полученная от пациента с хроническим миелогенным лейкозом) все клетки продемонстрировали связывание Ab79. Линия рака молочной железы, MCF7, оказалась отрицательной в связывании Ab79 (данные не приведены).

Антитела, конъюгированные с Alexa Fluor®-488, окрашивали в виде срезов толщиной 8 мкм, замороженных в криостате, которые были фиксированы в смеси этанол/ацетон в течение 5 мин с последующей инкубацией с антителами в течение 1 ч при комнатной температуре в камере с регулируемой влажностью. Затем срезы промывали, добавляли DAPI, содержащий гистологическую среду (Vector Laboratories, cat #H1500), и использовали покровное стекло.

Пример 6. Оценка экспрессии Ab79 при множественной миеломе (ММ) и хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ).

Связывание Ab79 с образцами костного мозга пациентов с множественной миеломой анализировали при помощи проточной цитометрии либо после обогащения для CD138<sup>+</sup> клеток, либо стробированием на CD138<sup>+</sup>CD45<sup>-/lo</sup> клетках (фиг. 7A). Было обнаружено, что Ab79 экспрессируется на >95% клеток четырех из шести образцов множественной миеломы. Связывающая часть Ab79 оказалась в значительной степени похожей на связывающую часть антитела к CD38, используемого в клинических лабораториях. Кроме того, Ab79 связывал клетки пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (фиг. 7B).

Для измерения связывания Ab79 с ММ и ХЛЛ FACS анализом, образцы, отобранные у пациентов, были обработаны в течение 24 ч. Мононуклеарные клетки периферической крови были выделены Ficoll-Paque™ (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ экспрессии проводили с использованием следующих панелей антител с клонами в круглых скобках. ММ панель: Ab79-Alexa Fluor®-488, CD45-PerCP (2D1), CD138-APC (MI15). ХЛЛ панель: Ab79-Alexa Fluor®-488; CD5-PE (UCHT2), CD45-PerCP (2D1), CD19-APC (SJ25C1). 5 мкл PE, PerCP или APC меченого антитела или 10 мкл антитела, меченого Alexa Fluor®-488, или изотипа контрольной группы было добавлено в каждую лунку или пробирку, содержащую либо 100 мкл МКПК в концентрации 0,2×10<sup>6</sup> или CD138 обогащенных клеток из аспирата костного мозга. Образцы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после

чего эритроциты лизировали с использованием раствора BD Pharmlyse в соответствии с инструкциями производителя. Все образцы промывали три раза в FACS буфере. Образцы фиксировали в 1% параформальдегиде и анализировали на приборах BD FACSCanto™ II или BD FACSCaliber™.

Пример 7. Исследования CDC, индуцированные антителом к CD38.

Перекрестно-реактивные клоны яванского макака были протестированы на способность индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). MOLP-8 клетки высевали при плотности 10000 клеток на лунку в черные 96-луночные плоскодонные планшеты для тканевых культур в 50 мкл полной среды (RPMI, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки). 50 мкл 2× антитела к CD38, контрольного IgG антитела или только среду добавляли в каждую лунку и оставляли для инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин. В зависимости от клеточной линии, в каждую лунку, за исключением контрольных лунок, были добавлены различные количества (2-15 мкл) очищенного комплемента кролика (cat #CL 3441 Cedarlane Laboratories, Канада). После инкубации в течение одного часа при 37°C планшеты были доведены до комнатной температуры, на лунку было добавлено 100 мкл реагента CytoTox Glo™ для клеточной титрации (Promega G7571/G7573), планшет встряхивали в течение 5-7 мин и считывали люминесценцию на люминесцентном Envision® (Perkin Elmer) планшет-ридере. Условия анализа: только клетки, клетки + комплемент, клетки + контрольный IgG + комплемент, клетки + антитело + комплемент. % CDC рассчитывали по следующему уравнению:

$$100 - (RLU_T / RLU_C) \times 100.$$

где  $RLU_T$  - это относительные единицы люминесценции исследуемого образца и

$RLU_C$  - это относительные единицы люминесценции образца только с комплементом.

Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения PRISM. Значения  $EC_{50}$ , определенные согласно графиков % CDC по отношению к концентрации антитела, приведены в табл. 1.

Пример 8. Исследования ADCC, индуцированные антителом к CD38.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) была оценена при помощи Daudi, MOLP-8 и RPMI-8226 клеточных линий в качестве клеток-мишеней. PBMC выделяли как эффективные клетки сепарацией Ficoll-Plaque™ из лейкоцитарной пленки или LRS, которые были получены из Stanford Blood Center (Palo Alto, Калифорния). Образцы разводили 1:3 2% FBS в PBS. 15 мл Ficoll-Plaque™ (GE Healthcare) осторожно наслаивали на 35 мл разбавленного образца и центрифугировали при 1800 rpm (разбежка) в течение 25 мин. Отбиралась мутная промежуточная фаза, содержащая МКПК, промывалась 3 раза 2% FBS в PBS и замораживали аликвоты с концентрацией  $50 \times 10^6$  клеток/мл на аликвоту в 10% DMSO/FBS. Замороженные аликвоты МКПК оттаивали и культивировали в течение ночи в 10% FBS/RPMI+5 нг/мл рекомбинантного ИЛ-2 человека (R&D systems #202-IL) в концентрации  $2 \times 10^6$  на мл, при необходимости.

Для исследования ADCC все шаги были выполнены в полной среде. 5000 клеток-мишеней высевали на лунку в 96-луночный планшет в 50 мкл 3× антитела к CD38, контрольного IgG или только среды с последующим добавлением 50 мкл эффекторных МКПК человека в соотношении клетки-мишени:эффекторные (М:Э) клетки между 1:25 до 1:50. Планшеты быстро центрифугировали в течение ~30 с при 800 rpm, чтобы расположить все клетки в непосредственной близости. После 4 ч при 37°C планшеты центрифугировали при 1100 rpm в течение 5 мин и 100 мкл супернатанта переносили в белый планшет. 100 мкл реагента CytoTox Glo™ (Promega cat # G9292) добавляли к супернатанту и планшеты оставляли для встряхивания в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Люминесценцию считывали на люминесцентном Envision® (Perkin Elmer) планшет-ридере и процент специфического лизиса рассчитывали по следующей формуле:

$$(RLU_T / RLU_{E/T}) / (RLU_L / RLU_{E/T}) \times 100$$

где  $RLU_T$  - это относительные единицы люминесценции исследуемого образца и

$RLU_{E/T}$  - это относительные единицы люминесценции образца, содержащего клетки-мишени и только эффекторные клетки,

$RLU_L$  - это относительные единицы люминесценции клеток, лизированных Triton X-100.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения PRISM. Значения  $EC_{50}$ , определенные согласно графиков % специфического лизиса в зависимости от концентрации антитела, приведены в табл. 1.

Таблица 1

## CDC, ADCC и агонистичная активность IgG-реформатированных антител

Антитело	CDC EC50 нМ (MOLP-8)	ADCC EC50 нМ (DAUDI)	ADCC EC50 нМ (MOLP-8)	ADCC EC50 нМ (RPMI- 8226)	Апоптоз EC50 нМ (DAUDI)
BM-1	0,48±0,16	0,03±0,02	0,036±0,013	0,13±0,03	0,057
BM-2	0,65±0,18	0,04±0,02	0,024±0,005	0,15±0,04	0,062
Ab19	0,98±0,26	0,08±0,03	0,038±0,008	0,46±0,15	0,032
Ab43	2,2	0,12±0,09	0,027±0,018	3,84±1,34	1,56
Ab72	0,66±0,49	0,14±0,12	0,193±0,037	2,35±0,99	0,35
Ab79	1,1±0,39	0,03±0,02	0,047±0,012	0,46±0,19	0,048
Ab110	1,99±0,71	0,24±0,17	0,874±0,804	2,98±0,91	0,40
Ab164	2,00±0,83	Нет данных	0,165±0,154	1,2±0,24	0,31

Пример 9. Определение аффинности FACS анализом.

MOLP-8 клетки, экспрессирующие CD38, суспендировали в 1% FBS буфере при концентрации жизнеспособных клеток приблизительно 2 млн клеток/мл. Тестируемые mAb серийно разводили (в 2 раза) через лунки в двух 96-луночных планшетах в 1× PBS. Последняя лунка каждой титрации содержала только буфер. Дополнительные PBS и клеточные суспензии были добавлены в каждую лунку таким образом, чтобы конечный объем составил 300~л/лунку, и каждая лунка содержала приблизительно 100000 клеток. Ниже перечислены mAb с соответствующим окончательным диапазоном концентрации сайта связывания mAb (2× молекулярная концентрация), используемых для титрации:

- Тест-1, [mAb] сайт связывания=50,8 нмоль -49,7 пмоль;
- Тест-2, [mAb] сайт связывания, e=49,5 нмоль -48,3 пмоль;
- Ab 43, [mAb] сайт связывания=49,3 нмоль -48,2 пмоль;
- Ab 110, [mAb] сайт связывания=204 нмоль -49,9 пмоль;
- Ab 79, [mAb] сайт связывания=103 нмоль -25,3 пмоль;
- Ab 72, [mAb] сайт связывания=103 нмоль -25,2 пмоль;
- Ab 19, [mAb] сайт связывания=100 нмоль -12,2 пмоль.

Планшеты помещали в планшетный шейкер на 5 ч при 4°C, после чего планшеты промывали 3 раза при 4°C 1×PBS. Затем в каждую лунку добавляли 200 мкл 99 нмоль Cγ5 Fc-специфического поликлонального антитела козы к IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-175-008), и планшеты встряхивали в течение 30 мин при 4°C. Планшеты вновь промывали дважды при 4°C 1× PBS, затем был использован проточный цитометр FACSCanto™ II HTS для записи средней интенсивности флуоресценции (MFI) 5000 событий для каждой лунки, содержащей концентрацию уникального сайта связывания mAb. График средней интенсивности флуоресценции как функция концентрации антитела связывающего сайта антитела была нелинейно подобрана программным обеспечением Scientist 3.0 при помощи приведенного ниже уравнения для оценки KD:

$$F = p [ (KD + LT + n(M)) - \{ (KD + LT + n(M))^2 - 4n(M)(LT) \}^{1/2} ] / 2 + B$$

где F (средняя интенсивность флуоресценции),

LT (общая концентрация сайта связывания mAb),

P (коэффициент пропорциональности, который соотносит произвольные единицы флуоресценции со связанным mAb),

M (молярная клеточная концентрация; 0,553 фМ, основанная на 100000 клеток в 300 мкл),

n (число рецепторов на клетку),

B (фоновый сигнал) и KD=константа равновесной диссоциации.

Для каждой кривой титрации антител, оценка KD производилась при свободном размещении P, n, B и KD при нелинейном анализе. Для подробного выведения данного уравнения, см. работу Drake and Klakamp (2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants," J. Immunol. Methods 318: 157-62, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. В табл. 3 перечислены полученные KD для всех антител в порядке убывания аффинности вместе с 95% доверительным интервалом для каждого, внесенном в скобки. Концентрация сайта связывания антитела (2× молекулярная концентрация) была использована для нелинейного проведения кривых по точкам.

Пример 10. Определение аффинности с использованием Biacore®.

Аффинности антител IgG к растворимому эктодомену CD38 (ECD) определяли при помощи анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore™ A100 при 22°C. Поликлональное антитело козы к IgG человека (Caltag H10500) иммобилизовали на CM5 биосенсорном чипе с использованием стандартного аминного связывания с точками 1, 2, 4 и 5 во всех четырех проточных кюветках в чипе. Уровни иммобилизации в каждой точке варьировали от 5865 RU до 6899 RU. CD38 человека был получен от R&D Systems (Cat # 2404-AC, Lot # PEH020812A). Исходная концентрация CD38 была определена при помощи способов, подробно описанных в Pace et al. (1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" Protein Science 4(11):2411-23 и Pace and Grimsley (2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration," in Current Protocols in Protein Science, Chapter 3: Unit 3.1, содержание которых включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Подвижный буфер получали путем дегазации забуференного HEPES физиологического раствора, 0,005% полисорбата 20 и добавление фильтруемого BSA до конечной концентрации 100 мкг/мл. Все восемь очищенных mAb разводили подвижным буфером до концентрации приблизительно 2 мкг/мл. Предварительные эксперименты оценили количество каждого захватываемого mAb для поддержания поверхностной емкости ( $R_{max}$ ) не более чем ~100 RU. Для каждого цикла захвата mAb/инъекции антигена mAb был захвачен в точках 1 и 5 в каждой проточной кювете с расположенными рядом точками 2 и 4, служившими в качестве соответствующих эталонных поверхностей. Каждое разбавленное mAb было захвачено течение 1 мин при скорости потока 10 мкл/мин, с последующим трехминутным потоком подвижного буфера для стабилизации поверхности. HuCD38 вводили во все четыре проточные кюветы в течение 120 с при 30 мкл/мин в диапазоне концентраций от 193,7 нМоль - 3,0 нМоль (2× серийное разведение) с последующей 15-минутной фазой диссоциации. Все образцы были подготовлены в подвижном буфере и были случайно введены трижды семью инъекциями буфера, рассеянных для двойного сравнения. Поверхности были регенерированы двумя 20-секундными импульсами 10 ммоль глицина, pH 1,7.

Все данные сенсограммы были обработаны программным обеспечением Scrubber 2.0c и в общем соответствовали модели взаимодействия 1:1 в Scrubber 2.0c. Полученные константы связывания приведены в табл. 2.

Таблица 2

Антитело	FACS KD (нМ) MOLP-8	FACS KD (нМ) RPMI-8226	Biacore K <sub>a</sub> (M-1c-1)	Biacore K <sub>d</sub> (c-1)	Biacore KD (нМ)
BM-1	1,1 (0,9)	802	4,49×10 <sup>4</sup>	2,46×10 <sup>-3</sup>	54,8
BM-2	1,6 (0,6)	428	4,24×10 <sup>5</sup>	2,27×10 <sup>-3</sup>	5,4
Ab19	0,4 (0,3)	-	1,54×10 <sup>5</sup>	8,10×10 <sup>-4</sup>	5,3
Ab79	1,2 (1,1)	508	1,22×10 <sup>5</sup>	6,75×10 <sup>-4</sup>	5,5
Ab72	0,6 (0,4)	-	1,44×10 <sup>4</sup>	1,82×10 <sup>-3</sup>	126
Ab110	1,0 (0,1)	-	1,22×10 <sup>5</sup>	1,71×10 <sup>-1</sup>	1400
Ab43	1,1 (0,3)	-	2,72×10 <sup>5</sup>	1,46×10 <sup>-1</sup>	537
Ab164	1,4 (0,7)	-	1,99×10 <sup>5</sup>	7,15×10 <sup>-2</sup>	359

Пример 11. Иммунофлюоресцентные исследования интернализации.

Иммунофлюоресцентные методики были использованы для оценки интернализации антитела к CD38 в MOLP-8 клетки. Были отобраны MOLP-8 клетки и концентрация клеток, равная 5×10<sup>6</sup>, была окрашена в течение 10 мин при 4°C в среде RPMI-1640, содержащей 1 мкг каждого антитела к CD38, непосредственно конъюгированного с Alexa Fluor® 488. Клетки промывали в PBS, содержащем 1% BSA, и клетки в концентрации 1×10<sup>6</sup> инкубировали в течение 3 или 6 ч при 4°C или 37°C. Поверхностное окрашивание гасили в течение 30 мин при 4°C с использованием 2 мкг Alexa Fluor®-488 антитела кролика (Invitrogen). Клетки промывали и фиксировали в PBS с 1% PFA, перенесенные в 96-луночный планшет Microtest (BD Biosciences), и исследовали либо при помощи проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FACSCanto™ II (BD Biosciences), либо визуализировали с использованием ImageXpress® Micro (Molecular Devices) при 20-кратном увеличении.

Пример 12. Связывание эпитопа при помощи Biacore®.

Оборудование Biacore® A100 было использовано для би~ двух тестовых антител, а также Ab19 и Ab79. Сперва антитела были иммобилизованы при высокой и низкой плотностях на CM5 чипах с использованием NHS/EDC связывающих реакций. Для каждого цикла эксперимента связывания эпитопа на эти

поверхности вначале вносили CD38. Аналогично сэндвич-анализу в формате ELISA, уникальное антитело (избранное из множества иммобилизованных антител) затем вносили на поверхности, содержащие комплексы CD38/антитело. Поверхности регенерировали с использованием пульсов фосфорной кислоты в конце каждого цикла. Данные были собраны при 22°C с использованием HBS-P (10 mM HEPES10, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005%) P-20) с добавлением BSA. Полученные сенсограммы обрабатывали с использованием модуля "EpiTope Mapping" пакета программного обеспечения Biacore® A100 Evaluation, а также пробной версии Scrubber для A100 для наборов данных. Для генерации двоичной 4×4 матрицы для вышеуказанных 4 моноклональных антител из двух отдельных экспериментов были использованы дублирующие данные, как показано в табл. 3.

Таблица 3

	Ab79	BM1	Ab19	BM2
Ab79	0	0	1	1
BM1	0	0	1	0
Ab19	1	1	0	0
BM2	1	0	0	0

Пример 13. In vivo анализ в онкологии.

Эффективность Ab19 и Ab79 была испытана in vivo на модели десиминированной Daudi-люциферазной лимфомы человека. 6-8 недельным самкам SCID CB.17 мышей из Taconic Laboratories внутривенно вводили концентрацию Daudi-Luc клеток опухоли, равную  $1 \times 10^6$ . На 7 сутки исследования мышам внутрибрюшинно вводили: паливизумаб, Ab79, Ab19, тест 1 и тест 2. Начиная с 21-го дня ежедневно проводили биолюминесцентную визуализацию с использованием системы IVIS Xenogen (Caliper Life Sciences) для контроля опухолевой массы. Для визуализации животным внутрибрюшинно вводили субстрат люциферазы (150 мг/кг) за 10 мин до визуализации, затем животных анестезировали изофлураном и получали изображение. Результаты продемонстрированы на фиг. 8 и 9.

Пример 14. Корреляция воспалительного/иммунологического заболевания.

Было продемонстрировано, что CD38 значительно активируется в МКПК клетках после активации. Среди покоящихся МКПК нормальных доноров менее, чем 20% покоящихся клеток экспрессируют CD38 с количеством рецепторов примерно 10000-20000 на клетку. Активированные МКПК, также нормальных доноров, продемонстрировали 60-75% клеток, экспрессирующих CD38, с количеством рецепторов 110000 до 160000 на клетку.

В дополнение к этому, как показано на фиг. 5, МКПК пациентов с СКВ характеризовались повышенной экспрессией CD38.

Образцы исследовали иммуногистологически на предмет избыточной экспрессии CD38. 19 образцов от пациентов с СКВ были проанализированы, повышенная экспрессия CD38 наблюдалась на В-и Т-клетках памяти и плазматоцитодных ДК. Были исследованы 3 пациента с РА, продемонстрировавшие инфильтрацию CD38-плазматическими клетками синовиальной ткани у всех трех пациентов, а также повышенное окрашивание синовиальной ткани с Ab79. Были исследованы 7 пациентов с болезнью Крона и 6 пациентов с язвенным колитом, и продемонстрировали инфильтрацию CD38-экспрессирующими плазматическими клетками гладкой мускулатуры толстой кишки (проверено на двух первичных образцах клеток пациентов). Следует отметить, что было исследовано такое же количество здоровых пациентов, которые не продемонстрировали этих результатов.

Пример 15. Истощение с использованием антител к CD38.

Яванские макаки, которым была введена доза Ab79, демонстрируют значительное снижение лимфоцитов, В- и Т-клеток и NK-клеток. Антитело вводили путем 30-минутной внутривенной инфузии в дозах, продемонстрированных на фиг. 6 с данными, собранными в течение 24 ч. Аналогичные данные были продемонстрированы на день 4, 7, 11 и 18.

Тем не менее, данные рК/рD демонстрируют выздоровление животных после введения дозы. Как показано на фиг. 7, количество лимфоцитов становится аналогичным количеству контрольной группы после периода от нескольких дней после однократной внутривенной 30-минутной инфузионной дозы, даже после наивысшей дозы, что указывает на отсутствие проблем с лимфоидными клетками-предшественницами.

Пример 16. Модели аутоиммунных заболеваний.

Используются три различные модели.

Мышиная модель HuScid служила как модель псевдореакции трансплантат-против-хозяина, а также как модель для противостолбнячного ответа, истощения IgG и общей выживаемости. CB17/HuSCID мышам вводили ASGM1 для истощения NK-клеток, а затем на другой день вводили МКПК человека. Период приживания составлял 7-10 дней, сыворотку отбирали для рандомизации Ig человека. На другой день мышам вводили восемь Ab79 в дозе 10 мг/кг с последующим введением TТd, со второй дозы через 4 дня, третьей дозой через три дня после этого, сыворотку собирали для подсчета Ig человека и обнаружения



противостолбнячного иммуноглобулина через 3 дня после этого (всего 10 дней от первой дозы). На фиг. 8 продемонстрированы результаты одной мыши-донора, которые указывают на значительное снижение всех Ig изотипов при лечении. На фиг. 9 продемонстрированы результаты средних уровней Ig для каждой группы реципиентов, при этом каждая точка данных представляет среднее значение в каждой группе (n=5 до n=10). На фиг. 10 продемонстрировано значительное снижение противостолбнячного ответа при лечении Ab79. Наконец, на фиг. 11 продемонстрировано общее существенное выживания с использованием лечения Ab79.

#### Эксперименты на суррогатных мышах

Поскольку Ab79 перекрестно не реагирует с CD38 грызунов, было создано суррогатное антитело. Предварительно с использованием коммерческого антитела к CD38 человека и коммерческого антитела к CD38 мыши, продемонстрированы значительные различия уровней экспрессии CD38 клеточными типами между человеком и мышью (см. фиг. 12), демонстрирующие, что биология заболевания различна. Таким образом, использование антител, перекрестно реагирующих с CD38 обезьяны, в моделях на обезьянах может дать значительно лучшие результаты.

Было создано суррогатное антитело, демонстрирующее сходное истощение CD38<sup>+</sup> клеток, полученных из селезенки, крови и костного мозга (данные не показаны), а также из периферической крови (см. фиг. 13). В дополнение к этому на фиг. 14 продемонстрирована кинетика истощения в селезенке, крови и костном мозге, полученных на 1, 2 или 3 день после одной дозы 10 мг/кг суррогатной мыши. Быстрое истощение В-клеток в крови было продемонстрировано в течение 24 ч с более медленным истощением, продемонстрированным в селезенке и костном мозге.

#### Мышиная модель СКВ

Суррогатное антитело мыши к CD38 исследуют на MRL/lpr модели, используя следующие промежуточные считывания (например, каждые две недели), в крови: аутоантитела к двухцепочечной ДНК, СВС, FACS для Т/В лимфоцитов, белок альбумина мочи и воспаление кожи. Конечное считывание в крови включает, но не ограничивается: аутоантителами к двухцепочечной ДНК, СВС, FACS для Т/В лимфоцитов, из селезенки, лимфатических узлов и костного мозга: весом органов, количеством иммунных клеток, FACS для Т/В лимфоцитов, в почках: весом органов, гистопатологией (H&E и PAS), внутриклеточным расположением, клетками воспаления и воспалением кожи (гистопатологией).

#### Модель коллаген-индуцированного артрита (CIA)

Была использована мышьяная модель с использованием суррогатного антитела мыши с 7 группами мышей для оценки как про-профилактической, профилактической и терапевтической эффективности. Всех мышей иммунизировали СII/CFA на 0 день, бустер-инъекцией СII/CFA на 21 день, как правило приводящие к прогрессированию заболевания с 21 по 42 день (окончание исследования). Группе 1 (10 мышей) интраперитонеально вводили 10 мг/кг суррогатного антитела два раза в неделю, начиная с 0 дня (про-профилактически). Группе 2 (n=10) вводили то же самое количество, но начиная с 21 дня. Группе 3 (n=10) вводили то же самое количество с момента начала заболевания (25-28 день). Группе 4 (n=10) вводили те же дозы, но с hIgG1 (например, изотип) на 0 день. Группе 5 (n=10) вводили ту же дозу hIgG1, но начиная с 21 дня. Группе 6 (n=10) вводили на 21 день 0,5 мг/л дексаметазон в воде и группе 7 (n=5) ничего не вводили.

Исследование CIA на яванском макаке проводится с использованием n=3 в каждой группе, группа 1 - наивные животные, только носитель. Группе 2 вводят разовую дозу Ab79 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг, q1w (профилактическое лечение начинается на 7 день после иммунизации коллагеном). Группе 3 вводят Ab79 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг q1w, для терапевтического лечения, начиная с начала заболевания, 21 день или 28 день. Группе 4 вводят 0,1 мг/кг q1d с дексаметазоном также в начале заболевания.

## Список последовательностей.

SEQ ID NO:1 (CD38 *Homo sapiens*; NP\_001766.2)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALCLGVSLVLLVVLAVVVPWRQQWSPGTTKR  
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNK  
ILLWSRIKDLAHQFTQVQVQVQVDMFTLEDLLGLYLLADDLWTCGEFNTSKINYQSCPDRKDCSNNP  
VSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGRSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQVLEAWVIHGG  
EDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO:2 (CD38 *Macaca fascicularis*; AAT36330.1)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALVCLGVCLLVLLVAVVAVVLPWRQQWSPGTTTS  
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVVKLGTQTVPCNK  
KTLWSRIKDLAHQFTQVQVQVQVDMFTLEDMLLGLYLLADDLWTCGEFNTFEINYQSCPDRKDCSNN  
PVSFVWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGRSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQVLEAWVIHGG  
REDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI

SEQ ID NO:3 (HCDR1 Ab79)

GFTFDDYG

SEQ ID NO:4 (HCDR2 Ab79)

ISWNGGKT

SEQ ID NO:5 (HCDR3 Ab79)

ARGSLFHDSSGFYFGH

SEQ ID NO:6 (LCDR1 Ab79)

SSNIGDNY

SEQ ID NO:7 (LCDR2 Ab79)

RDS

SEQ ID NO:8 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLGS

SEQ ID NO:9 (тяжелая цепь Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSDISWNGGKT  
HYVDSVKGQFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGLTLTVT  
SSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:10 (легкая цепь Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL  
FPPSSEEL

SEQ ID NO:11 (тяжелая цепь Ab19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDK  
DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGLTLTVS  
SASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:12 (легкая цепь Ab19)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT  
LFPPSSEEL

SEQ ID NO:13 (HCDR1 Ab19)

GFTFNND

SEQ ID NO:14 (HCDR2 Ab19)

ISYDGSDK

SEQ ID NO:15 (HCDR3 Ab19)

ARVYYYGFSGPSMDV

SEQ ID NO:16 (LCDR1 Ab19)

NSNIGSNT

SEQ ID NO:17 (LCDR2 Ab19)

SDS

SEQ ID NO:18 (LCDR3 Ab19)

QSYDSSLGSR

SEQ ID NO:19 (тяжелая цепь Ab19) с константой

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDK  
DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGSPMDVWGQGLTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA  
LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:20 (легкая цепь Ab19) с константой

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT  
LFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLS  
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:21 (тяжелая цепь Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDISWNGGKT  
HYVDSVKGQFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGLTVTVS  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:22 (легкая цепь Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL  
FPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:23 (CD157 Homo sapiens; NP\_004325)

MAAQGCAASRLQLLQLLLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALL  
SPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFAD  
NTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGLDYQSCPTS

EDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGGFFADYEIPNLQKEKITRIE  
IWMHEIGGPNVESCCEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAA  
AATQRKAPSLYTEQRAGLIIPFLVLASRTQL

SEQ ID NO:24 (Тест 1; переменная область тяжелой цепи)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGT  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGPEVFDYWGQGTLVTVS  
S

SEQ ID NO:25 (Тест 1; переменная область легкой цепи)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGI  
PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:26 (Тест 2; переменная область тяжелой цепи)

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFDYWMQWVKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDT  
GYAQKFGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYSNSLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:27 (Тест 2; переменная область легкой цепи)

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSI TCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGV  
PDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:28 (тяжелая цепь Ab43)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSRINSDGSST  
SYADSMKGQFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYYYAMDVWGQGTLVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29 (легкая цепь Ab43)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGYKTVNWIYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCAAWDDSLNGLVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:30 (тяжелая цепь Ab72)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGST  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNYDFWGSYYYGMDVWGQGTLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 (легкая цепь Ab72)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAARSTNIIFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:32 (тяжелая цепь Ab110)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIYSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRATWGGATHDYWGQGLTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSL  
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33 (легкая цепь Ab110)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGVLFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:34 (тяжелая цепь Ab19) с константой

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS DK  
DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGLTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA  
LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:35 (легкая цепь Ab19) с константой

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSG  
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT  
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLS  
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Данное описание настоящего изобретения подробно и имеет ссылки на конкретные варианты его воплощения, должно быть понятным, что возможны модификации и изменения, не выходящие за объем настоящего изобретения, определенного в прилагаемой формуле изобретения. В частности, хотя некоторые аспекты настоящего изобретения определены здесь как особенно предпочтительные, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается этими конкретными аспектами настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ истощения активированных клеток, экспрессирующих белок CD38 человека, представленный SEQ ID NO: 1, путем контакта клеток с антителом или его фрагментом, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающим

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 8.

2. Способ диагностики аутоиммунного заболевания, демонстрирующего либо повышенную экспрессию CD38, либо повышенное число клеток, экспрессирующих CD38, как компонента заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающих

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 8.

3. Способ по п.2, в котором аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из миастении гравис, аутоиммунной тромбоцитопении, иммуноопосредованной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита и реакции трансплантат-против-хозяина.

4. Способ лечения гематологического рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающего

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO: 8.

5. Способ по п.4, в котором гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, плазматочного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 9 или вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10.

7. Способ по любому из пп.1-5, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 9, а вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10.

8. Способ по любому из пп.1-5, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21 или легкая цепь содержит SEQ ID NO: 22.

9. Способ по любому из пп.1-5, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21, а легкая цепь содержит SEQ ID NO: 22.

10. Выделенное антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с CD38 человека, представленным SEQ ID NO: 1, и CD38 яванского макака, представленным SEQ ID NO: 2, содержащие

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 6;

- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 8; и одну или более сконструированных гликоформ.

11. Выделенное антитело или его фрагмент по п.10, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с  $KD 10^{-8}$  М или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

12. Выделенное антитело или его фрагмент по п.10 или 11, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент взаимодействуют по меньшей мере с K121, F135, Q139, D141, E239, W241, C275, K276, F284, P291 и E292 SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.

13. Выделенное антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с CD38 человека, представленным SEQ ID NO: 1, и CD38 яванского макака, представленным SEQ ID NO: 2, содержащие

а) переменную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 5, и

б) переменную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 8; и

одну или более сконструированных гликоформ;

где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

14. Выделенное антитело или его фрагмент по п.13, в которых переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 9.

15. Выделенное антитело или его фрагмент по п.13 или 14, в которых переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

16. Выделенное антитело или его фрагмент по п.13, в которых тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 21.

17. Выделенное антитело или его фрагмент по п.13 или 16, в которых легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 22.

18. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.13-17, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с  $KD 10^{-8}$  М или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

19. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.13-18, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент взаимодействуют по меньшей мере с K121, F135, Q139, D141, E239, W241, C275, K276, F284, P291 и E292 SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.

20. Выделенное антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с CD38 человека, представленным SEQ ID NO: 1, и CD38 яванского макака, представленным SEQ ID NO: 2, содержащие

а) переменную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 5; и

б) переменную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 8; и

одну или более сконструированных гликоформ;

где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

21. Выделенное антитело или его фрагмент по п.20, в которых переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 9 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10.

22. Выделенное антитело или его фрагмент по п.20, в которых тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21 и легкая цепь содержит SEQ ID NO: 22.

23. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.10-15 и 18-21, дополнительно содержащие Fc-домен.



24. Выделенное антитело или его фрагмент по п.23, отличающиеся тем, что Fc-домен является Fc-доменом человека.

25. Выделенное антитело или его фрагмент по п.24, отличающиеся тем, что Fc-домен является вариантным Fc-доменом по сравнению с последовательностью Fc дикого типа.

26. Выделенное антитело или его фрагмент по п.24, отличающиеся тем, что выделенное антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело IgG человека.

27. Выделенное антитело или его фрагмент по п.26, отличающиеся тем, что антитело IgG человека представляет собой антитело IgG1 человека.

28. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.10-27, отличающиеся тем, что сконструированная гликоформа включает гликозилирование одного или более полипептидов, и где гликозилирование представляет собой гликозилирование через N-связь или гликозилирование через O-связь.

29. Выделенное антитело или его фрагмент по п.28, отличающиеся тем, что гликозилирование представляет собой гликозилирование через N-связь.

30. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающих

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

одну или более сконструированных гликоформ.

31. Способ по п.30, отличающийся тем, что указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из миастении гравис, аутоиммунной тромбоцитопении, иммуноопосредованной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита и реакции трансплантат-против-хозяина.

32. Способ лечения гематологического рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающих

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

одну или более сконструированных гликоформ.

33. Способ по п.32, в котором гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, плазматического лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта.

34. Способ истощения активированных клеток, экспрессирующих белок CD38 человека, представленный SEQ ID NO: 1, путем контакта клеток с антителом или его фрагментом, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающими

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую

- i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
- iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

одну или более сконструированных гликоформ.

35. Способ диагностики аутоиммунного заболевания, демонстрирующего либо повышенную экспрессию CD38, либо повышенное число клеток, экспрессирующих CD38, как компонента заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2),

включающих

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и
- b) переменную область легкой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

36. Способ по п.35, в котором аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из миастении гравис, аутоиммунной тромбоцитопении, иммуноопосредованной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита и реакции трансплантат-против-хозяина.

37. Способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей белок CD38 человека, представленный SEQ ID NO: 1, путем приведения указанной клетки в контакт с антителом или его фрагментом, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающими

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и
- b) переменную область легкой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

38. Способ ингибирования биологической активности белка CD38 человека (SEQ ID NO: 1) путем приведения белка в контакт с выделенным антителом или его фрагментом антитела, которые взаимодействуют по меньшей мере с K121, F135, Q139, D141, E239, W241, C275, K276, F284, P291 и E292 SEQ ID NO: 1, где выделенное антитело или его фрагмент связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2) и включают

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и
- b) переменную область легкой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8; и

39. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающих

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и
- b) переменную область легкой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
  - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8;

где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из миастении гравис, аутоиммунной тромбоцитопении, иммуноопосредованной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

40. Способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей белок CD38 человека, представленный SEQ ID NO: 1, путем приведения указанной клетки в контакт с выделенным антителом или его фрагментом, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающими

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
  - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 3;

- ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 4;
  - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 5; и
  - b) переменную область легкой цепи, содержащую
    - i) первый CDR, включающий SEQ ID NO: 6;
    - ii) второй CDR, включающий SEQ ID NO: 7;
    - iii) третий CDR, включающий SEQ ID NO: 8.
41. Способ по любому из пп.30-40, отличающийся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 9 или переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10.
42. Способ по любому из пп.30-40, отличающийся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 9 и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10.
43. Способ по любому из пп.30-40, отличающийся тем, что тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21 или легкая цепь содержит SEQ ID NO: 22.
44. Способ по любому из пп.30-40, отличающийся тем, что тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21 и легкая цепь содержит SEQ ID NO: 22.
45. Выделенное антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с CD38 человека, представленным SEQ ID NO: 1, и CD38 яванского макака, представленным SEQ ID NO: 2, содержащие
- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую
    - i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 3;
    - ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 4;
    - iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 5; и
  - b) переменную область легкой цепи, содержащую
    - i) первый CDR, имеющий SEQ ID NO: 6;
    - ii) второй CDR, имеющий SEQ ID NO: 7;
    - iii) третий CDR, имеющий SEQ ID NO: 8,
 где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
46. Выделенное антитело или его фрагмент по п.45, в которых переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
47. Выделенное антитело или его фрагмент по п.45 или 46, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент взаимодействует по меньшей мере с K121, F135, Q139, D141, E239, W241, C275, K276, F284, P291 и E292 SEQ ID NO: 1, на основе нумерации человеческой последовательности.
48. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.45-47, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с  $KD 10^{-8}$  M или большей аффинностью, и где аффинность определена стандартным анализом Вiasoge.
49. Выделенное антитело или его фрагмент по п.45, в которых переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
50. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.45-49, отличающиеся тем, что Fc-домен выделенного антитела или его фрагмента является Fc-доменом человека.
51. Выделенное антитело или его фрагмент по п.50, отличающиеся тем, что Fc-домен является вариантным Fc-доменом по сравнению с последовательностью Fc дикого типа.
52. Выделенное антитело или его фрагмент по п.50, отличающиеся тем, что выделенное антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело IgG человека.
53. Выделенное антитело или его фрагмент по п.52, отличающиеся тем, что антитело IgG человека представляет собой антитело IgG1 человека.
54. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента по п.45.
55. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента по п.45.
56. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь выделенного антитела или его фрагмента по п.45, содержащую SEQ ID NO: 21.
57. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь выделенного антитела или его фрагмента по п.45, содержащую SEQ ID NO: 22.
58. Композиция для получения антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента по п.45, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи выделенного анти-

тела или его фрагмента по п.45.

59. Композиция по п.58, где

вариабельная область тяжелой цепи для первой нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 9,

вариабельная область легкой цепи для второй нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 10.

60. Композиция для получения антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь выделенного антитела или его фрагмента по п.45, содержащую SEQ ID NO: 21, и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь выделенного антитела или его фрагмента по п.45, содержащую SEQ ID NO: 22.

61. Композиция для получения антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), содержащая первый экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п.54 или 56, и второй экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.55 или 57.

62. Экспрессионный вектор, содержащий

нуклеиновую кислоту по п.54 и нуклеиновую кислоту по п.55,

нуклеиновую кислоту по п.56 и нуклеиновую кислоту по п.57 или

композицию по любому из пп.58-60.

63. Клетка-хозяин, содержащая

нуклеиновую кислоту по п.54 и нуклеиновую кислоту по п.55,

нуклеиновую кислоту по п.56 и нуклеиновую кислоту по п.57 или

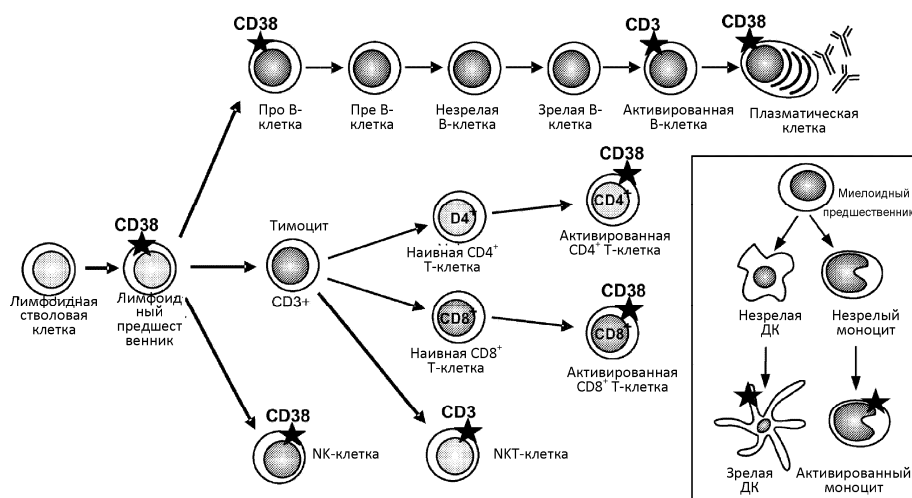
композицию по любому из пп.58-60,

композицию по п.61 или

экспрессионный вектор по п.62.

64. Способ получения антитела или его фрагмента, которые специфически связывают CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 2), включающий культивирование клетки-хозяина по п.63, где производится антитело или его фрагмент.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.10-29 и пп.45-53 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель.



Фиг. 1

Тяжелая цепь Ab79 (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDIS  
WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH  
DSSGFYFGHWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN  
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь Ab79 (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ  
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLT  
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK  
AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP  
TECS

Тяжелая цепь Ab19 (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVI  
SYDGSDDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY  
GFGSPMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN  
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 2А

Легкая цепь Ab19 (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN  
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKL  
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV  
KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP  
TECS

Фиг. 2В

CD38 Homo sapiens (Идентификационный номер NP\_001766.2; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALCLGVSLVLLVVLAVVVPRWRQQWSGPGTKR  
FPETVLARCVKYTEIHPMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQT  
VPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCP  
DWRKDCSNPVSFVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRKIFDKNSTFGSVEVHNLQ  
PEKVQTLAEWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESISKRNIFCKNIYRPDKFLQCVKNPE  
DSSCTSEI

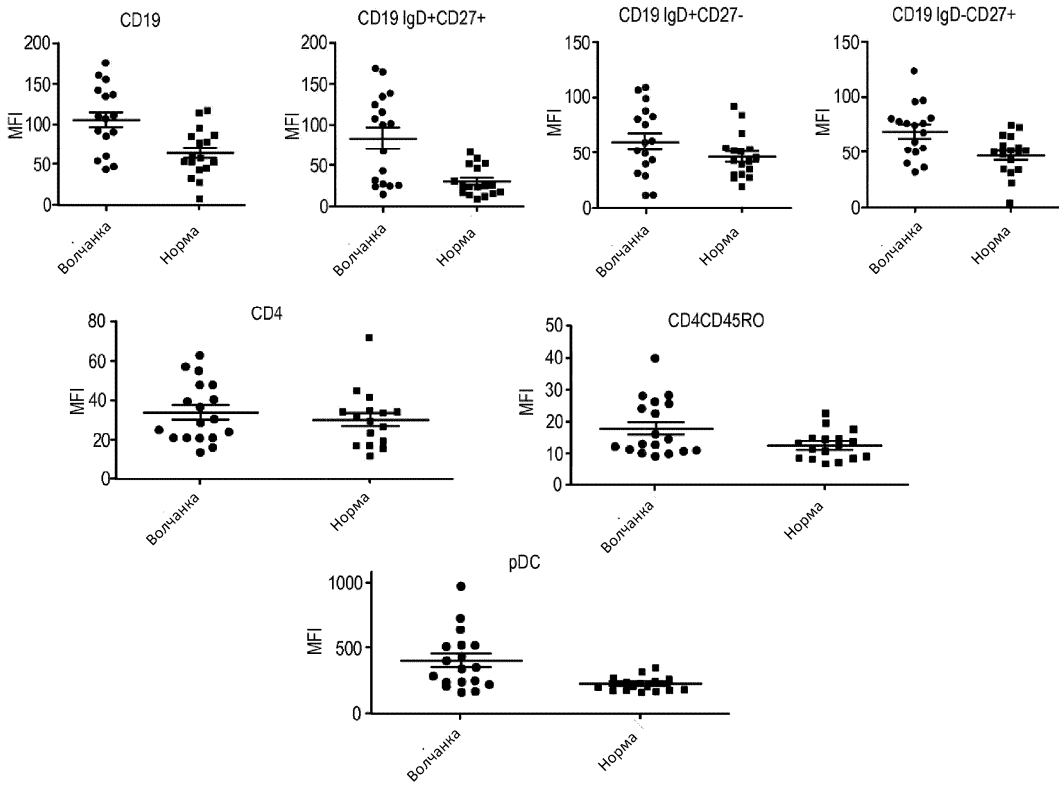
CD38 Macaca fascicularis/яванского макака/макака-крабоеда (Идентификационный номер AAT36330.1; SEQ ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALQVCLGVCLLVLLVVLAVVVPRWRQQWSGSGTTS  
RFPETVLARCVKYTEVHPMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQT  
TVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFNTFEINYQSCP  
PDWRKDCSNPVSFVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRKIFDKNSTFGSVEVHNL  
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN  
PEDSSCLSGI

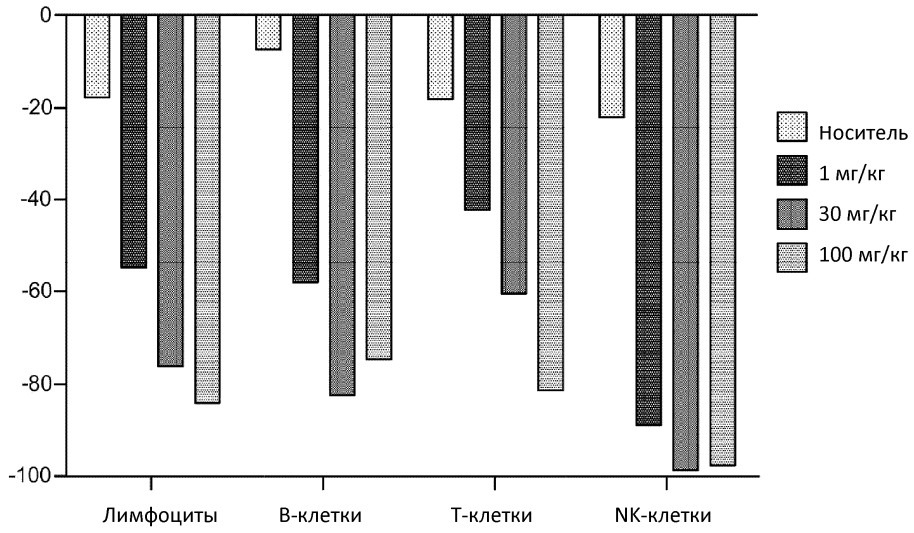
Фиг. 3

BM2		BM1		TSF19		TSF79	
E	76	N	120	G	91	K	121
H	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
M	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	M	110	E	239
L	112	V	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
T	114	Q	236	Q	115	C	275
Q	115	T	237	T	148	K	276
T	116	E	239	V	192	F	284
V	117	W	241	R	194	V	288
C	119	Q	272	R	195	K	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	P	291
T	191	C	275	A	199	E	292
V	192	K	276	H	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	P	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
E	198	T	297	K	234		
A	199	S	298				
Q	231						
E	233						
K	234						

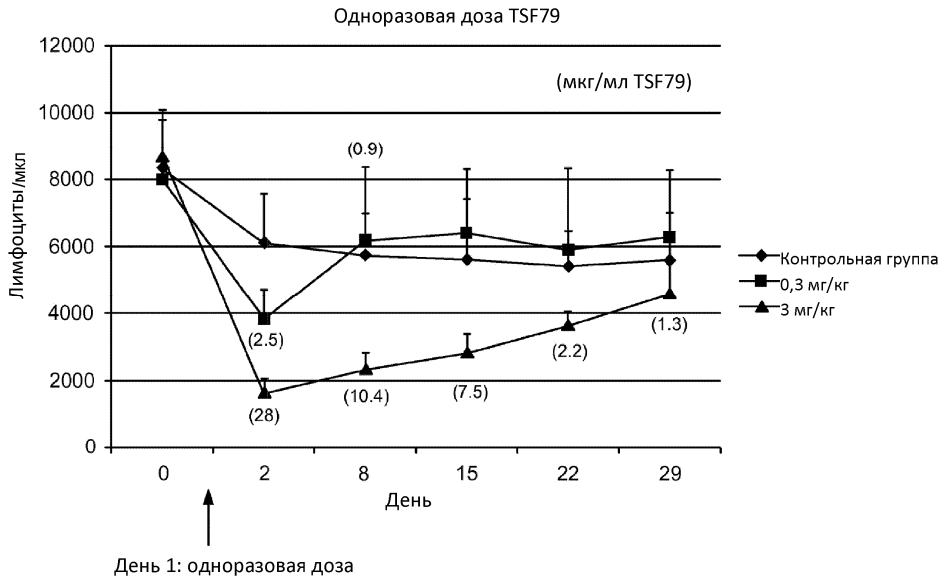
Фиг. 4



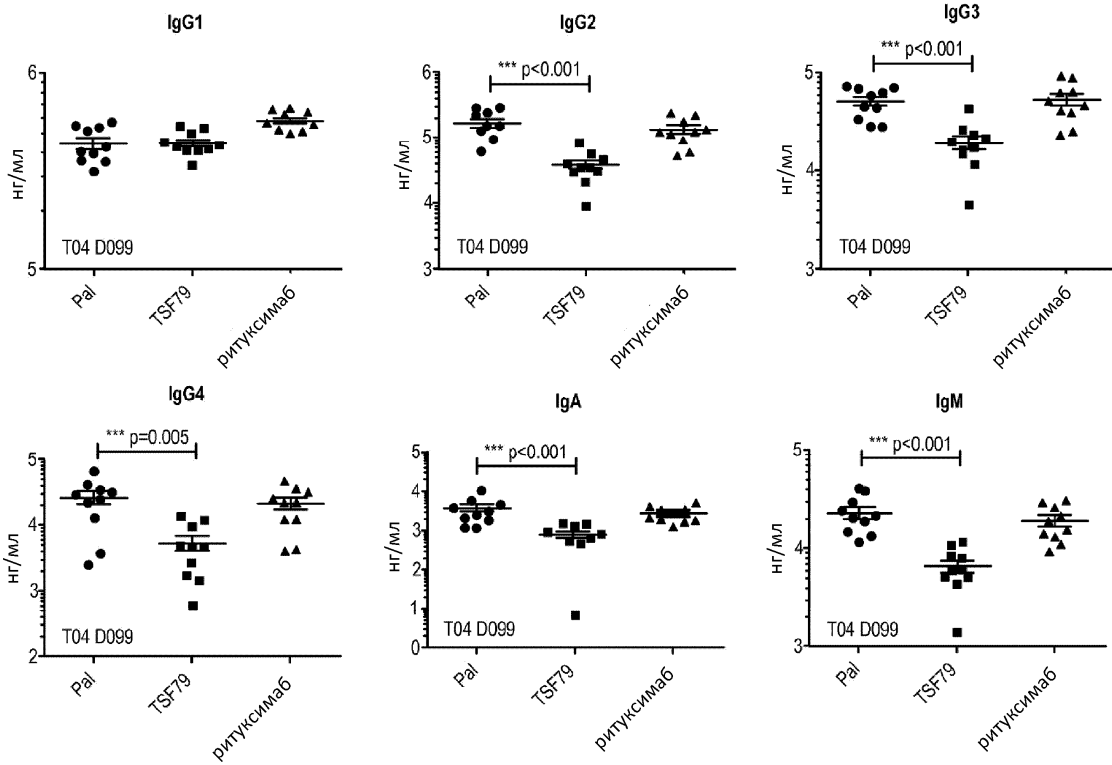
Фиг. 5



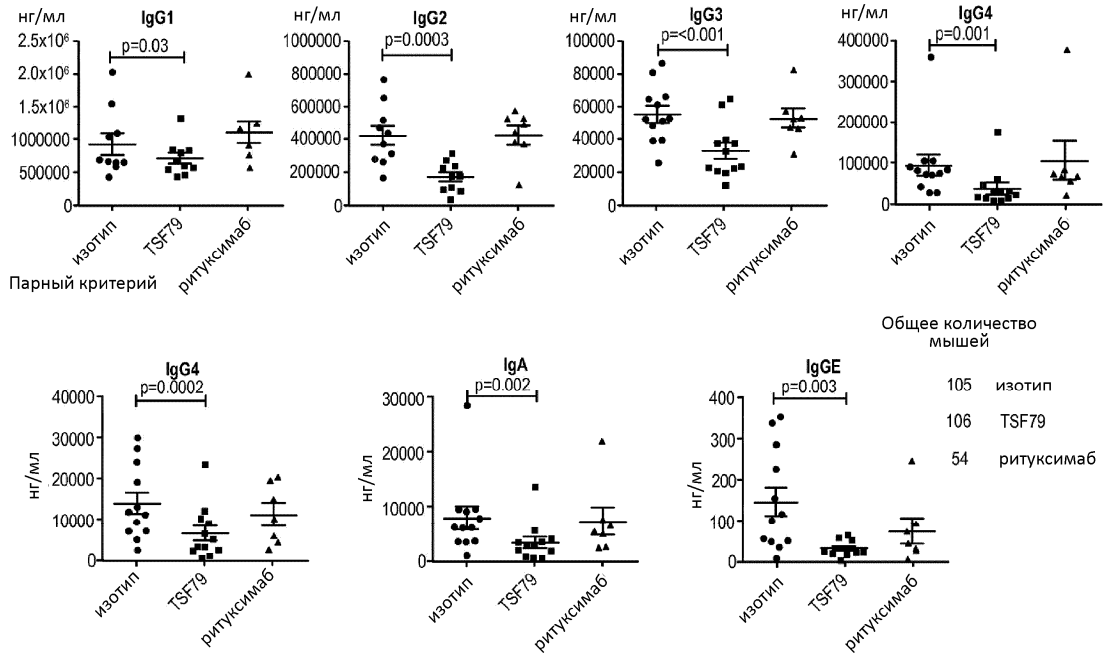
Фиг. 6



Фиг. 7

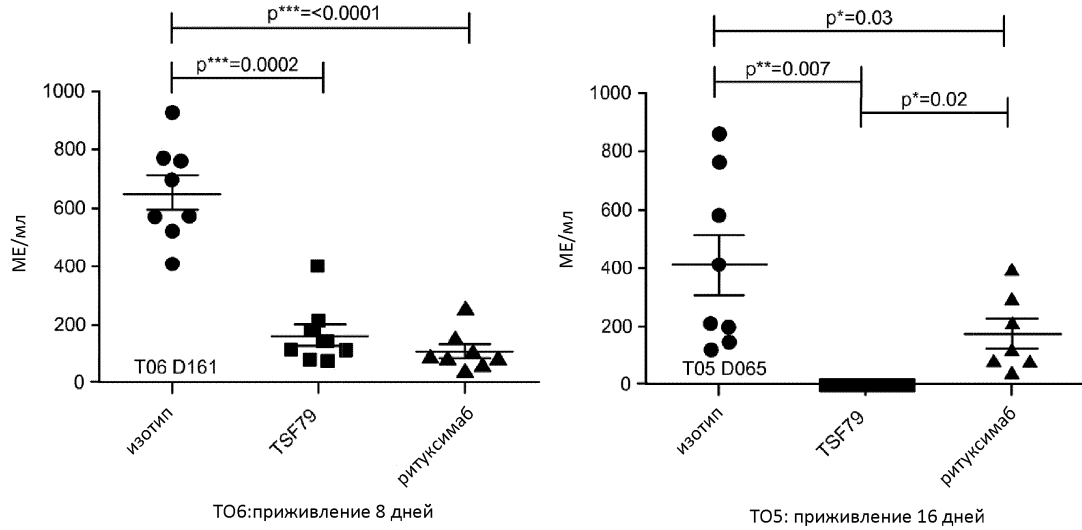


Фиг. 8



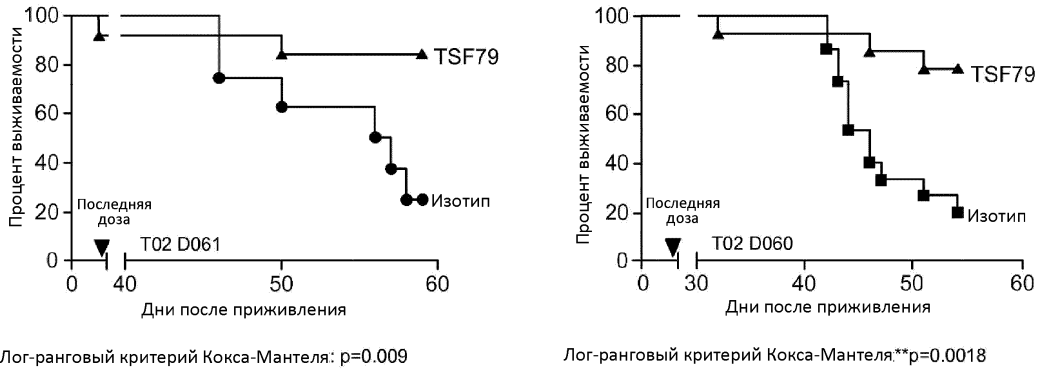
Фиг. 9



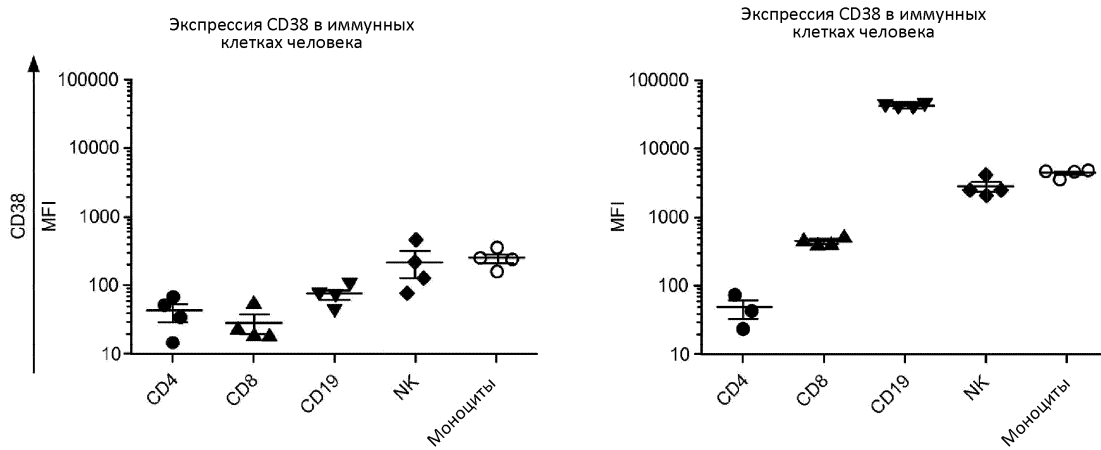


Фиг. 10

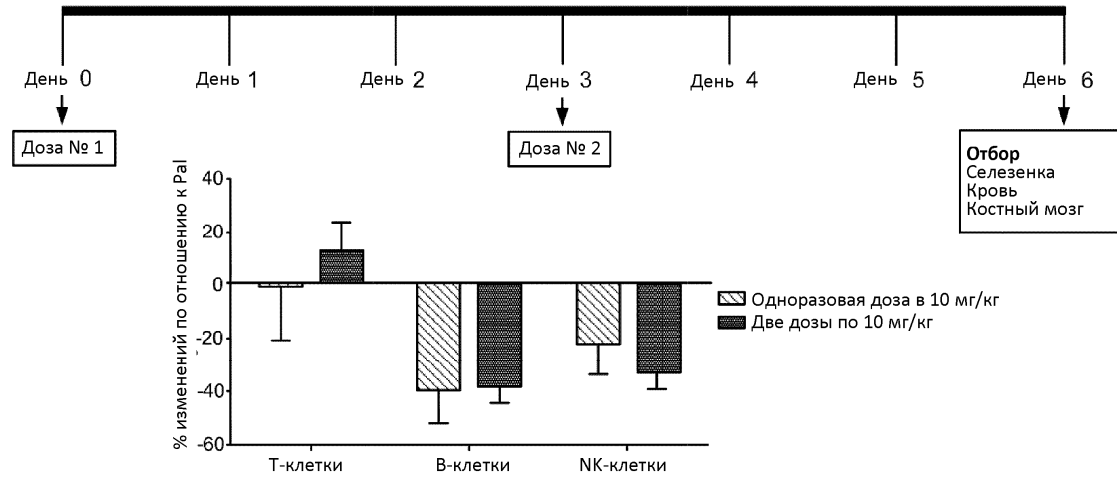
Выживаемость



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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