## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2023.01.31
- (22) Дата подачи заявки 2011.12.30

- **(51)** Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
- (54) АНТИТЕЛА К CD38 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРА 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
- (62) 201791186; 2011.12.30
- (71) Заявитель: 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)

(57) Описаны выделенные антитела, связывающиеся с CD38 человека и CD38 яванского макака. Также приведены фармацевтические композиции, содержащие описанные антитела, терапевтические и диагностические способы использования описанных антител.

# АНТИТЕЛА К CD38 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРА И КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с  $\S$  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 2011г. 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. СD38 является членом группы мембраносвязанных или растворимых ферментов, содержащей CD157 и АДФР-циклазу моллюска Это семейство ферментов обладает Aplysia. уникальной способностью преобразовывать НАД В циклическую аденозиндифосфорибозу или никотиновая кислота-адениндинуклеотид фосфат.

В дополнение к этому сообщалось, что CD38 участвует в мобилизации  $Ca^{2+}$  и в передаче сигнала через Tyr-фосфорилирование многочисленных сигнальных молекул, в том числе фосфолипазы  $C\gamma$ , 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 СD38-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 СD38 является СD31 (РЕСАМ-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 CD38-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 СD38 несовместимо с жизнью. Анализы более 5000 образцов крови новорожденных не смогли определить хотя бы одного CD38-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.

СD38 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 T-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз

(ОЛЛ), Т-клеточную лимфому (TCL), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), лимфому Ходжкина (ЛХ) и хронический миелолейкоз (ХМЛ). С другой стороны, большинство примитивных плюрипотентных стволовых клеток кроветворной системы являются  $CD38^-$ (фигура 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 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, отличающееся область тяжелой цепи вариабельная COCTONT ИЗ трех гипервариабельных участков (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 отличающееся тем, что вариабельная 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 вариабельной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариабельной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 9. В других вариантах воплощения настоящего изобретения выделенное антитело состоит из вариабельной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариабельной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 10.

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

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 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, отличающееся TeM, вариабельная область тяжелой цепи COCTONT ИЗ трех гипервариабельных участков (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и отличающееся тем, что вариабельная 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 вариабельной области тяжелой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариабельной области тяжелой цепи охватывается SEQ ID NO: 19. В других вариантах воплощения настоящего выделенное антитело состоит из вариабельной области легкой цепи, отличающееся тем, что последовательность вариабельной области легкой цепи охватывается SEQ ID NO: 20.

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

охватывается SEQ ID NO: 20. Данная комбинация вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной 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 ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 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 B-клетках (CD19+CD20+), плазматических клетках (CD138+CD19-CD20-), активированных CD4+ и CD8+ T-клетках, NKT-клетках (CD3+CD56+) и NK-клетках (CD56+CD16+). B дополнение K этому, экспрессия CD38 обнаруживается на лимфоидных клетках-предшественницах (CD34+CD45RA+CD10+CD19-), но не лимфоидных стволовых клетках. B дополнение K этому, повышенная экспрессия CD38 наблюдается на зрелых ДК и активированных моноцитах.

 $\Phi$ игура 2 демонстрирует последовательности тяжелой и легкой цепи Ab79 и Ab19.

Фигура 3 иллюстрирует последовательности CD38 человека и яванского макака.

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

Фигура 5 иллюстрирует повышенную экспрессию СD38 на МКПК больных СКВ с использованием коммерчески доступного антитела к CD38 человека.

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

 $\Phi$ игура 7 демонстрирует восстановление истощения после однократной дозы Ab79.

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

Фигура 9, сходная с фигурой 8 касательно истощающей активности Ab79 у HuSCID мышей, как описано в Примерах.

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

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

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

Фигура 13 демонстрирует терапевтический эффект в условиях воспаления, демонстрируя, что суррогатное мышиное 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+ 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 СD38 была описана для различных заболеваний гемапоэтического происхождения 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), Dürig et al. (2002)), В-клеточный хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз (Keyhani et al (2000)), включая В-

острый лимфобластный лейкоз, макроглобулинемию клеточный Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, лимфому из клеток мантийной зоны, пролимфоцитарный/миелолцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (Keyhani *et* al. (1993)), хронический al. (1993)), фолликулярную миелоидный лейкоз (Marinov *et* лимфому, NK-клеточный лейкоз и плазмаклеточный 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 воспаления лечении и/или иммунологических нарушений, ассоциированных с активированными лимфоцитами, в частности включая аутоиммунные заболевания. Как показано в документе, CD38 экспрессируется в незрелых гемопоэтических В клетках, ингибируется зрелых клетках И повторно экспрессируется на высоких уровнях в активированных лимфоцитах и плазматических клетках. Например, высокая экспрессия СD38 наблюдается на активированных В-клетках, плазматических клетках, активированных СD4+ Т-клетках, активированных CD8+ Тклетках, NK-клетках NKT-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 ограничивающихся 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 связываются 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-крабоед, иногда называемый в настоящем документе как "cyno") 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 АДФ-рибозилциклазу 1, цАДФР-гидролазу 1, CD38-rs1, гидролазу 1 циклической АДФ-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 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 лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон 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. IqM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь IgM1 и IgM2. Таким образом, "изотип" в контексте настоящего описания означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определенный химическими 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 ответственность за распознавание 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 (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 последовательности. Вариативность в вариабельной распределена неравномерно. Вместо этого, V-области состоят из относительно инвариантных участков, называемых участками (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных

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 амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Гипервариабельная область, как правило, охватывает аминокислотные остатки приблизительно аминокислотных ОТ 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 Kabat et al., SEQUENCES OF тяжелой цепи; IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th 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 EC, используемой для Fc-области.

СDR 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 антиген 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 демонстрирующим способность ОДНОГО 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 фигуре 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,

С275, 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. Каbat et al. собрали многочисленные первичные последовательности вариабельных 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,  $5^{\rm th}$  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 (СН) и домены шарнира. В контексте IgG антител, каждый из IgG изотипов имеет три СН-области. Соответственно, "СН" доменами в контексте IgG являются следующие: "СН1" относится к позиции 118-220 в соответствии с индексом ЕС согласно Каbat. "СН2" относится к позиции 237-340 в соответствии с индексом ЕС согласно Каbat и "СН3" относится к положениям 341-447 в соответствии с индексом ЕС согласно Каbat.

Другим типом Ід-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 СН1-домен IgG заканчивается в позиции по EC 220 и CH2-домен IgG начинается с остатка в позиции по EC 237. Таким образом, для IgG шарнир антитела в настоящем документе определен как включающий позиции 221 (D221 236 (G236 в IgG1), в котором нумерация IgG1) ДО 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 Fcобласти. 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 Fcобласть иммуноглобулина состоит из доменов Су2 и Су3 (Су2 и С $\gamma$ 3) и нижней шарнирной области между С $\gamma$ 1 (С $\gamma$ 1) и С $\gamma$ 2 (С $\gamma$ 2). Хотя границы Fc-области могут варьировать, тяжелая цепь Fcобласти IgG человека, как правило, определяется, как включающая остатки С226 или Р230 к его карбоксильному концу, в котором нумерация осуществляется в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat. В некоторых вариантах воплощения изобретения, как это ниже, в Гс-область более подробно описано внесенные аминокислотные модификации, например, для изменения связывания с одним или более FcyR-рецепторами или с FcRn-рецептором.

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

Кроме того, антитела могут быть различными по структуре, ограничиваясь включая, HO не фрагментами антител, биспецифическими моноклональными 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 вариабельной области; (v) изолированные CDR-области; (vi),  $F(ab')_2$ -

фрагменты, бивалентные фрагментам, 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 (ix) "диатела" или посредством ссылки) и "тритела", мультивалентные ИЛИ мультиспецифические фрагментам, 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, сочетающим области более, чем одного вида. Например, традиционно "химерные антитела" содержат вариабельную область (ти) мыши (или крысы в некоторых случаях) и константную область (ти) человека. "Гуманизированные антитела" в целом относятся к нечеловеческим антителам, которые имели вариабельные домены каркасных участков, замещенные последовательностями, обнаруженными в антителах человека. Как правило, гуманизированном антителе все антитело, В 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

вариабельного участка антитела человека для создания антитела, специфичность которого определяется пересаженными 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, BCe включены во всей своей полноте посредством ссылки). Оптимально гуманизированное антитело также будет содержать, по меньшей часть константной области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека, и, следовательно, будет типично содержать Гс-область человека. Гуманизированные антитела также быть получены с использованием мышей с генетически сконструированной иммунной системой. Roque et al., 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 (CM. Tsurushita&Vasquez, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), и приведенные в этом во всей документе ссылки, все включены своей посредством ссылки). Способы гуманизации включают, но не ограничиваются способами, описанными в работах Jones et al., 321:522-525; Riechmann et al.,1988; 1986, Nature 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. или другие способы снижения Гуманизация иммуногенности

вариабельных 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 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 вариабельных 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. 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.

ОДНОМ варианте воплощения настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению МОГУТ мультиспецифическими антителами и, особенно биспецифическими антителами, также иногда называемыми "диатела". 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 лекарственной 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  ${
m KD}$  для антигена или эпитопа по меньшей мере приблизительно  $10^{-4}$ M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-5}$  M, по меньшей мере приблизительно  $10^{-6}\ \mathrm{M}$ , по меньшей мере приблизительно  $10^{-7}\ \mathrm{M}$ , по  $10^{-8}$  M, меньшей мере приблизительно ПО меньшей приблизительно  $10^{-9}$  М, альтернативно по меньшей мере приблизительно  $10^{-10}$  М, по меньшей мере приблизительно  $10^{-11}$  М, по меньшей мере приблизительно  $10^{-12}\,\mathrm{M}$ , 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 КА или Ка 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 КА или Ка 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 Fcобласти, 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, проделанных с CDR либо Ab79, либо Ab19, например, антитело должно по-прежнему специфически связываться как с CD38 человека, так и CD38 яванского макака. Аналогично, аминокислотные варианты проделываются с Fc-областью, например, вариантные 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 Fcобласти дикого типа или генно-инженерных белков, а также от 1 ДО 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 \$100A 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 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 имеющем тех альтераций. В некоторых случаях, хотя и редко, желательным может быть уменьшение аффинности антитела к его антигену, но это, как правило, не является предпочтительным.

Афинное 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 сравнению с "исходным" антителом. Предпочтительные раз по аффинно зрелые антитела будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности к антигену-мишени. Аффинно антитела получают при помощи известных процедур. См., например, работу Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783, в которой аффинное созревание путем перестановки доменов описано 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. 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 проводится 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) FcyRI (CD64), включая изоформы FcyRIa, FcyRIb и FcyRIc; FcyRII (CD32), включая

изоформы FcyRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcyRIIb (включая FcyRIIb-1 и FcyRIIb-2), и FcyRIIc; и FcyRIII (CD16), включая изоформы FcyRIIIa (включая аллотипы V158 и F158, коррелирующие с антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)) и FcyRIIIb (включая аллотипы FcyRIIIb-NA1 и FcyRIIIb-NA2), FcRn (неонатальный рецептор), Clq (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, 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341769, патенте US  $\mathbb{N}$ 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 Гс-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 дериватизирующим агентом, способным реагировать с избранными боковыми цепями или N-, или С-концевыми остатками.

Остатки цистеинила наиболее часто вступают в реакцию с  $\alpha$ -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,  $\alpha$ —бром— $\beta$ —(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 дериватизируются реакцией с диэтилпирокарбонатом при рН 5,5-7,0, так как этот агент относительно специфичен для боковой цепи гистидила. Также используется пара-бромфенацилбромид, реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М натрия какодилата при рН 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; Ометилизомочевину, 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 рКа функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также эпсилон-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 используются N-ацетилимидазол и тетранитрометан для образования соединений О-ацетилтирозила И 3-нитропроизводных, соответственно. Остатки тирозила йодируются с использованием 125І или 131І для создания меченых белков для использования в

радиоиммунном анализе, описанный выше способ с использованием хлорамина Т является подходящим.

Боковые карбоксильные группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют путем реакции с карбодиимидами (R'-- 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 глутамила преобразуются в остатки аспарагинила 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, Nгидроксисукцинимидные эфиры, например, наифе 4азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'дитиобис (сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватизирующие агенты, метил-3-[(пара-азидофенил)дитио]пропиоимидат такие как позволяют получить фотоактивируемые промежуточные продукты, способные к образованию поперечных сшивок в присутствии света. Альтернативно, высокореактивные водонерастворимые такие как "cynomolgusogen" бромид-активированные углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах U.S. №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, все включены во всей своей полноте посредством ссылки, используемые для иммобилизации белков.

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

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и

лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (T. E. 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 С-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).

### Гликовилирование

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 ADCC показано, коррелирует C увеличением функции, предположительно за счет тесной связи с рецептором FcyRIIIa. 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 FcyRIIIa.

Сконструированные гликоформы могут быть созданы использованием различных способов, известных в данной области техники (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol 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, Швейцария]). Многие из этих методик основаны на регулировании уровня фукозилированных и/или разветвленнных олигосахаридов, ковалентно присоединенных к Гс-области, например, экспрессии IgG в различных организмах или клеточных линиях, сконструированных или созданных иным способом (например, клетки Lec-13 CHO ИЛИ клетки гибридомы крысы YB2/0, регулирования ферментов, вовлеченных в путь гликозилирования FUT8 [ $\alpha$ 1,6-фукозилтрансферазы] и/или (например,  $\beta 1 - 4 - N$ ацетиглюкозаминтрансферазы III [GnTIII]), либо путем модификации углевода (ов) после экспрессии IgG. Например, "сахар сконструированное антитело" или "SEA технология" 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 тэжом 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 О-связь. N-гликозилирование относится к присоединению углеводного остатка к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х - любая аминокислота, кроме пролина, являются последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводного остатка к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой ИЗ XNTC трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин могут быть использованы 5гидроксилизин.

Включение сайтов гликозилирования в антитело осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более ИЗ вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов Nгликозилирования). Изменение также может быть проделано путем добавления или замещения одного или нескольких остатков серина или треонина для начала последовательности (для сайтов гликозилирования). Для удобства аминокислотная последовательность антитела предпочтительно модифицируется в результате изменений на уровне ДНК, В частности, 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 caxapa (N-ацетилглюкозамина ИЛИ Nацетилгалактозамина), оставляя полипептид интактным. Химическое дегликозилирование описано в работах Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al., 1981, Anal. Віосћет. 118:131, которые включены во всей своей полноте посредством ссылки. Ферментативное отщепление углеводных остатков полипептидов может быть достигнуто путем использования экзогликозидаз, как различных эндо- и описано 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 U.S. № 2005/0114037A1, 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, приведено выше, некоторые аминокислотные замены). приведено выше, эти антитела могут характеризоваться набором 6 вариабельными областями или полноразмерными тяжелыми и легкими цепями, включая константные области. В дополнение к могут как приведено выше, быть осуществлены аминокислотные замены. В общем, В контексте изменений в структуре CDR, в связи с относительно короткой длиной CDR, аминокислотные модификации, правило, характеризуются как 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 перекрестнореактивными с CD38 человека и CD38 яванского макака и, таким образом, являются межвидовыми перекрестнореактивными "Межвидовое перекрестнореактивное антитело" антителами. является антителом, обладающим аффинностью связывания антигеном, характерной для первого вида млекопитающего, которая является практически идентичной аффинности связывания гомолога антигена вторым видом млекопитающего. перекрестная реактивность может быть выражена, например, как соотношение KD антитела для антигена первого вида млекопитающего к KD того же антитела для гомолога того же второго вида млекопитающего, антигена 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 реактивностью", перекрестной если OHO 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, 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, СD38, в присутствии исследуемого соединения. например, правило, конкуренция подразумевает, ПО меньшей мере, 10-100%-ное приблизительно снижение связывание антитела изобретению CD38 В согласно настоящему С присутствии конкурента, что измерено стандартными методиками, такими как ELISA или анализы Biacore®. 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 20%-ное меньшей мере, приблизительно относительное ингибирование связывания до того, как антитело рассматривается достаточно конкурентное. В случаях, когда принадлежащие конкурирующим антителам, в антигене расположены 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, СD38 (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, оценки наличия конкуренции методом ELISA требуется ДЛЯ приблизительно 5-50 мкг (например, приблизительно 10-50 мкг, 20-50 приблизительно 5-20 приблизительно MKT, приблизительно 10-20 мкг и т.д.) антитела к CD38 и/или CD38мишений. Условия также должны быть пригодны для связывания. Как правило, физиологические или близкие к физиологическим условиям 20-40°C, температура приблизительно (например, Нф 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 ингибирования более высокого предела относительного критерия/детерминанты того, что является подходящим уровнем конкуренции в конкретном контексте (например, где анализ конкуренции используется для отбора или скрининга 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, GPIIA, 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, способности взаимодействовать С лигандами, ферментативную активность, сигнальную активность И, в частности, 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 СD38-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

СD38-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 CD3 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 нелеченными 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 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 антитела согласно настоящему изобретению являются общепринятыми полноразмерными антителами, например, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная 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 вариабельные, 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 может ДНК. ДНК быть синтетические двухцепочечной одноцепочечной, и в случае одноцепочечной может быть кодирующей (смысловой) цепью или некодирующей (антисмысловой) Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, описанной в документе, или может быть отличной кодирующей настоящем 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 экспрессионный вектор различный (например, тяжелая 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, 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), 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 клеткихозяина). Полученная рекомбинантная клетка-хозяин 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 (СНО), НЕК 293 клетками, NSO клетками, HeLa клетками, клетками почки детеньша хомяка (ВНК), 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, экспресии, очистки и скрининга описаны, например, в работах Antibody Engineering, edited by Kontermann&Dubel, Springer, Heidelberg, 2001и 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 И NMMYHHMMN заболеваниями, В 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,  $CD4^+$ клетках, активированных Т-клетках, плазматических активированных CD8+ Т-клетках, NK-клетках, NKT-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.

образом, любое аутоиммунное заболевание, Таким повышенную экспрессию CD38, демонстрирующее либо либо повышенное число клеток, экспрессирующих СD38, 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 анемиею, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную крапивницу, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, синдром Кастельмана, целиакию-спру-дерматит, синдр иммунной дисфункции хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Черджа-Стросса, 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-IqM-полинейропатию, иммунноопосредованную тромбоцитопению, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, плоский лишай, красную волчанку, болезнь Меньера, 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

печени, псориаз, псориатический 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, CD38, включающие введение экспрессирующих пациенту фармацевтически эффективного количества описанного антитела. В 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, 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 СD38 обнаруживается в 10-30% клеток, возможно рассматривать как имеющую слабую CD38 позитивность, а популяцию клеток, в которой экспрессия СD38 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", злокачественным относящийся к новообразованиям кроветворных тканей и включающий в себя лейкоз, лимфому и множественную миелому. Неограничивающие примеры состояний, ассоциированных с экспрессией CD38, включают, ограничиваются множественной миеломой (Jackson et al. (1988), Exp. Immunol. 72: 351-356), В-клеточным хроническим Clin. лимфолейкозом (В-ХЛЛ) Dürig 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 24: 153-9), Research хроническим лимфолейкозом миелобластным лейкозом ИЛИ хроническим хроническим миелолейкозом (ХМЛ), острым миелобластным лейкозом или острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), лейкозом (HCL), волосатоклеточным миелодиспластическими (МДС) или хроническим миелолейкозом (ХМЛ-БП) в синдромами 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 миелобластного лейкоза (ОМЛ) и острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ).

Кроме того, в данной области техники известно, что экспрессия СD38 является прогностическим показателем для пациентов с состояниями, такими как, например, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (Dürig et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; и Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32) и острый миелобластный 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 является неизлечимым заболеванием, характеризующимся постепенным увеличением анергичных моноклональных клеток Влинии, накапливающихся в костном мозге и периферической крови продолжительным образом на протяжении многих лет. Экспрессия СD38 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 основном осуществляется цитостатическими И В препаратами хлорамбуцилом или флударабином. При возникновении рецидивов часто проводится сочетанная терапия с использованием флударабина, циклофосфамида в комбинации с ритуксимабом (моноклональное антитело к CD20) или кэмпасом (моноклональное к CD52). Таким образом, существует критическая неудовлетворенная медицинская потребность в лечении В-ХЛЛ. В некоторых вариантах настоящего изобретения воплощения предлагаются способы лечения В-ХЛЛ с применением описанных CD38 как проведено ниже, антител к (N,это может быть реализовано при помощи комбинации лекарственных препаратов, включающих необязательно и независимо любое из вышеуказанных лекарственных средств).

В-ХЛЛ характеризуется двумя подтипами, хроническим агрессивным. Эти клинические фенотипы коррелируют с наличием или отсутствием соматических мутаций В гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (IqVH). В контексте настоящего описания хронический В-ХЛЛ относится к нарушению у субъекта, имеющего мутировавший IqVH и/или ген 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 или более клинических фенотипов, ассоциированных ОДИН 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. Опнако наблюдаются лишь незначительные изменения в общей выживаемости, и средняя выживаемость составляет около 3 лет. Таким образом, критическая неудовлетворенная существует медицинская в лечении множественной миеломы. некоторых воплощения настоящего изобретения предлагаются вариантах 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 (ATCK).

### 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: і) пациенты с прогрессирующим заболеванием и іі) 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 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]) B 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 другие органические кислоты; антиоксиданты,

аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилили 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 маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие как сахароза, противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как  $TWEEN^{m}$ ,  $PLURONICS^{m}$  или полиэтиленгликоль  $(\Pi \ni \Gamma)$ .

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 микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные ИЛИ микрокапсулы желатиновые поли (метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в

Remington's Pharmaceutical Sciences 16th 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.

быть изготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из гидрофобных полимеров, содержащих антитело, чьи матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением , испфеикоп гидрогели (например, гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент U.S. № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и неразлагаемый этиленвинилацетат, этил-L-глутамата, гамма. разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В TOвремя 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 антитела остаются в организме в длительного времени, они могут денатурировать или в результате воздействия влаги при 37°C, агрегировать 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 образованием S--S-связи обусловлен межмолекулярным 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

Антитела и химиотерапевтические агенты согласно настоящему изобретению вводят субъекту в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течении времени, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацереброспинальным, подкожным, интраартикулярным, внутрисуставным, интратекальным, пероральным, местным или ингаляционным путями. Предпочтительным является внутривенное или подкожное введения антитела.

#### Способы лечения

способах согласно настоящему изобретению используется для обеспечения положительного терапевтического В отношении заболевания или состояния. Поп терапевтическим ответом" "положительным 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 заболевания 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  $\kappa$  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 антителом к СD38 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 анормальных 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 печения ОПУХОЛИ возможно также измерить способностью его 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 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 контексте настоящего описания относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению, и единица содержит каждая 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~MT/kr, например, приблизительно 0,1-50~Mr/kr, например, приблизительно 0,1-20~Mr/kr, например, приблизительно 0,1-10~Mr/kr, например, приблизительно 0,3, приблизительно 1~или 3 мг/кг. В другом варианте воплощения настоящего изобретения антитело вводят в дозе 1~Mr/kr или более, например, в дозе от 1~до 20 мг/кг, например, доза от 5~до 20 мг/кг, например, доза 8~Mr/kr.

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 ЭTO 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 часов.

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

варианте воплощения настоящего изобретения ОДНОМ антитело к CD38 вводят в еженедельной дозе от 250 мг до 2000 мг, например, 300 мг, 500 мг, 700 мг, 1000 мг, 1500 мг или 2000 мг до 8 раз, например, от 4 до 6 раз. Введение может быть осуществлено путем непрерывной инфузии в течение времени от 2 до 24 ч, например, от 2 до 12 часов. 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 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 часа 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 ДНКповреждающих химиотерапевтических средств включают ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан, топотекан, камптотецин и аналоги или их метаболиты и доксорубицин), ингибиторы (например, этопозид, тенипозид топоизомеразы ΙI даунорубицин), 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 гефитиниб), ингибиторы протеасом (например, бортезомиб), NF-кВ-ингибиторы, включая ингибиторы ІкВ-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 СD38. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антитела, описанные настоящем документе, используются как для диагностики и для лечения, или только для диагностики. Когда антитела к СD38 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 Аb79 используется терапевтически или наоборот. Таким включенными в изобретение являются 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 документе, 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 радиоактивными или МОГУТ быть имыцэжет изотопами, в) низкомолекулярные метки, которые могут включать люминесцентные и колориметрические красители, или молекулы, такие как биотин, который дает возможность осуществлять другие способы мечения, и r) метки, такие как частицы (включая пузырьки ПЛЯ 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  $^{99}$ Tc-мечение или мечение с другим  $\beta$ -излучающим изотопом. Варианты данной методики могут включать использование магнитно-резонансной томографии (MPT) для улучшения визуализации на основе методики гамма-камеры. Подобные способы и принципы иммуносцинтиграфии

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 СD38 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 пациентачеловека или биологического образца, взятого у пациентачеловека.

Для диагностической визуализации радиоизотопы могут быть связаны с антителом к СD38, либо непосредственно, опосредованно при помощи промежуточной функциональной группы. Полезные промежуточные функциональные группы включают такие как этилендиаминтетрауксусная хелатирующие агенты, кислота и диэтилентриаминпентауксусная кислота (см., например, патент U.S. № 5057313). В таких диагностических тестах с участием антител к CD38, коньюгированных 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 (MPT) (см., например, патент U.S. № 6331175, в котором описаны методики MPT и подготовка антител, конъюгированных с MPT-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 монометиловый и циклогексиловый аналоги, используемые с диагностическими изотопами в общем энергетическом диапазоне от 60 до 4000 кэВ, например,  $^{125}$ I,  $^{123}$ I,  $^{124}$ I,  $^{62}$ Cu,  $^{64}$ Cu,  $^{18}$ F,  $^{111}$ In,  $^{67}$ Ga,  $^{99}$ Tc,  $^{94}$ Tc,  $^{11}$ C,  $^{13}$ N,  $^{15}$ O и  $^{76}$ 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 <sup>110</sup>In, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>18</sup>F, <sup>52</sup>Fe, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>86</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>94</sup>mTc, <sup>94</sup>Tc, <sup>99</sup>mTc, <sup>120</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>154-158</sup>Gd, <sup>32</sup>P, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>51</sup>Mn, <sup>52</sup>mMn, <sup>55</sup>Co, <sup>72</sup>As, <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br, <sup>82</sup>mRb, <sup>83</sup>Sr или другие ү-, β- 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.

и подобные хелаты при образовании комплекса с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, могут быть использованы для диагностических способов при помощи MPT в связи с антителами к CD38. Макроциклические хелаты, такие как NOTA, DOTA и ТЕТА, 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 кольцевого типа, хелаты такие как макроциклические полиэфиры, представляющие интерес ДЛЯ стабильного связывания радионуклидов, таких как <sup>223</sup>Ra, также могут быть пригодными в диагностических способах.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает диагностические коньюгаты антитела к CD38, в котором коньюгат 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,  $\gamma$ -,  $\beta$ -,  $\alpha$ -, 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 флуоресцеин, тербия, родамин, тетраметилродамин, HNEOE кумарин, метил-кумарин, квантовые ТОЧКИ HNEOGTNGE (также CM. U.S. называемые "нанокристаллы", cep. № 09/315584, включенная в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки), пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люцифер желтый, Cascade Blue. ТМ., техасский красный, цианиновые красители (Cy3, Cy5, и т.д.), красители Alexa (включая Alexa, фикоэритрин, BODIPY и другие, описанные в 6th Edition of the Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland, работа включена в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки).

МОГУТ быть оценены Окрашенные ткани измерением радиоактивности в качестве показателя количества CD38-пептидов, ассоциированных С опухолью. Изображения, полученные 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 этикетку. 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 может иметь стерильное состояния, И входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет 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, забуференный фосфатом физиологический 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

создания вектора, экспрессирующего CD38 (huCD38) из кДНК, полученной от Origene Technologies Trueclone® был выделен полинуклеотид, кодирующий Выделенный huCD38 был клонирован в стабильный экспрессионный вектор (XOMA, Inc), содержащий ген устойчивости к неомицину  $(neo^R)$ , который позволил отобрать G418 (генетицин)-устойчивые HuCD38 трансфектанты. ген, присутствующий В отобранных трансфектантах, секвенировали для идентификации любых ошибок последовательности. Ошибки в последовательности, отклонявшиеся от идентификационного номера по GenBank, NM 001775, были помощи сайт-направленного мутагенеза NGU использованием ПЦР. Конечная векторная ДНК была подтверждена 5'-секвенированием.

Для создания вектора, экспрессирующего CD38 яванского макака (cyCD38) из ДНК, полученной из кДНК здоровой ткани

селезенки яванского макака, полученной из Biochain Institute, был выделен полинуклеотид, кодирующий суCD38.

Выделенный cyCD38 был клонирован В стабильный экспрессионный вектор (XOMA, Inc), содержащий ген  $neo^R$ , который позволил отобрать G418 (генетицин)-устойчивые трансфектанты. cyCD38 ген, присутствующий в отобранных трансфектантах, идентификации любых ошибок секвенировали ДЛЯ последовательности. Ошибки в последовательности, отклонявшиеся идентификационного номера по GenBank, AY555148, 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 клонирован в стабильный экспрессионный вектор (ХОМА, Inc), ген neo<sup>R</sup>, который позволил отобрать содержащий 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 СD38-экспрессирующих клеток яичника китайского хомяка (CHO)

Для создания СНО клеток, экспрессирующих huCD38, muCD38 и суCD38, CHO 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 скининг клонов при помощи FACS анализа. Клоны с

наибольшим уровнем продуцирования пересевались и выращивались во встряхиваемых колбах. Наилучшие 2 клона были заморожены и/или культивировались для микоплазменного AVA тестирования и для увеличения размера.

Для создания репортера люциферазы для моделей диссеминированного ксенотрансплантата, коммерческий вектор, содержащий промотор CMV/ген люциферазы/неомицин селектируемый 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 pagore 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 часа, и полученный комплекс был поглощен 100 мкл суспензией (DYNABEADS® M-280стрептавидина Streptavidin, Invitrogen). Неспецифические фаги были удалены промывкой гранул промывочным буфером (5% молока В PBS). Связанные элюировали 0,5 мл 100 нМ триэтиламина (ТЕА) и немедленно нейтрализовали добавлением равного объема 1 M TRIS-CI, рН 7,4. Элюированный пул фагов был использован для инфицирования TG1 клеток E coli, растущих в логарифмической фазе и фагимид 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 Systems) для определения панели фрагментов антител, способных связывать CD38. Сортировка проводилась с использованием стандартных протоколов (см., например, Methods in Molecular 178: Antibody Phage Display: Biology, vol. Methods 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 4°С, свободные ИРОН при сайты связывания 5용 молоком в PBS в течение одного блокированы 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 примерно одного-двух часов. Лунки промывали и связанный фаг использованием стандартных способов элюировали С например, Sambrook and Russell, Molecule Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Элюированный фаг был амплифицирован путем заражения TG1 клетокхозяев E. coli в логарифмической фазе роста. Инфицированные TG1 клетки были восстановлены центрифугированием при 2500 PRM в течение пяти минут, высеяны на 15 см 2ҮТ-ампициллин-2% глюкоза агаровые планшеты и инкубированы при 30°C в течение ночи. повторен Процесс сортировки затем был с использованием амплифицированного Цикл сортировки, фага. элюирования амплификации был повторен трижды.

После завершения сортировки, для инокуляции среды в 96-луночных планшетах использовали отдельные колонии высеянных ТG1 клеток. Микрокультуры выращивали до 0D600=0,6, после чего экспрессию растворимого scFv индуцировали добавлением 1 мМ 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.

FACS-скрининге связывания использовались СНО клетки, стабильно экспрессирующие CD38 для скрининга scFvs периплазматическом экстракте (РРЕ) на способность связывать нативный, мембранносвязанный CD38. Исходные и CHO трансфектанты (клеточные линии, экспрессирующие CD38 человека или яванского макака, или CD38 мыши) ресуспендировали ПО

отдельности при концентрации 2×106 клеток/мл в PBS Technologies), 0,5% BSA (Sigma Aldrich) и 0, 1% NaN3 (Sigmaбуфер). Исходные СНО клетки, (FACS экспрессировали CD38, были использованы как отрицательный контроль. Аликвоты по двадцать пять мкл клеток высевали в 96луночные планшеты с V-образным дном (Costar Cat # 3897) и к клеткам было добавлено 25 мкл перипластического экстракта, содержащего Мус-меченый scFv-фрагмент антитела, затем смесь инкубировали при 4°С в течение 30 минут. Затем клетки промывали дважды, после чего осадок ресуспендировали в 25 мкл мышиного антитела к c-myc (1/1000 в FACS буфере) (Roche) и снова инкубировали при 4°С в течение 30 минут. 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 минут. Затем клетки дважды избытка несвязанного промывали для удаления антитела ресуспендировали в 70 мкл FACS буфера и анализировали на BD FACScan®. Полученные данные оценивали 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 СНО линии клеток

#### (CD38-)

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 (R&D Systems cat # 2404-AC или эквивалент) человека иммобилизированы стандартной реакцией аминного (Biacore®) на СМ5 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, рН 5,0 и введением на активированную поверхность достижения иммобилизации ДО

требуемого уровня (3-5) минут. Поверхность затем блокировали этаноламином. Периплазматические экстракты разбавляли один-кодному аналитическим подвижным буфером 10 мМ НЕРЕS, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и 0,05% полисорбата 20 при рН 7,4, с 2 мг/мл BSA (бычий сывороточный альбумин)). Разбавленный периплазматический экстракт вносили на поверхности поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на 30 минут в течение 300 секунд с дополнительными 900 секундами контролируемого времени диссоциации. Регенерация была проведена единичной 8-секундной инъекцией 100 мМ НСl. Данные эталонные точки вычитали из данных активной поверхности, затем кривые диссоциации были построены с использованием модели диссоциации 1:1 в программном обеспечении Biacore® T100.

Наивысшие по ранжированию scFv клоны были преобразованы в IqG1 антитела. FACS-скрининг связывания был повторен реформатированных клонах IgG1 с использованием исходных СНО клеток и CHO клеток, экспрессирующих CD38 человека, мыши и яванского макака, чтобы удостоверится в сохранении связывающих свойств, а также для оценки видовой перекрестной реактивности. FACS IgG-реформатированных характеристика клонов была проведена, как описано выше, но шаги, состоящие из добавления антитела к с-myc 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, ВМТК4-1 (также называемый Тест-1, ВМ-1, или ВМТК-1) (SEQ ID NO: 24 и 25; вариабельные области тяжелой и легкой цепи) и ВМТК4-2 (также называемый Тест-2, ВМ-2 или ВМТК-2) (SEQ ID NO: 26 и 27; вариабельные 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®) (Medlmmune), клинически утвержденное антитело, распознающее респираторно-синцитиальный вирус, служило отрицательным контролем для связывания CD38.

#### ПРИМЕР 5: Обнаружение связывания Аb79 иммунофлюоресценцией

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, контролем окрашивания. Полученные отрицательным иммунофлуоресцентные изображения приведены на фигуре Окрашивание, наблюдаемое для Аb79, 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).

Аb79, 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  $\sim 10\%$  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, RPMI и MCF7). MOLP-8 (множественная миелома человека), DAUDI (лимфобласты, полученные от пациента с лимфомой Беркитта) и RPMI (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 минут с

последующей инкубацией с антителами в течение 1 часа 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 (MM) и хроническом лимфоцитарном лейкозе (XJJ)

Связывание Ab79 с образцами костного мозга пациентов с множественной миеломой анализировали при помощи проточной цитометрии либо после обогащения для  $CD138^+$  клеток, либо стробированием на  $CD138^+CD45^{-/10}$  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 MM и XЛЛ FACS анализом, образцы, отобранные у пациентов, были обработаны в течение 24 часов. 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). XЛЛ панель: Ab79-Alexa Fluor®-488; CD5-PE CD45-PerCP (2D1), CD19-APC (SJ25C1). 5 мкл РЕ, PerCP или APC меченого антитела или 10 мкл антитела, меченного Alexa Fluor®-488, или изотипа контрольной группы было добавлено в каждую лунку или пробирку, содержащую либо 100 мкл МКПК в концентрации  $0,2 \times 10^6$  или CD138 обогащенных клеток из аспирата костного мозга. Образцы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего эритроциты лизировали с использованием Pharmlyse раствора BDВ 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 $\kappa$ 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 2х антитела к CD38, контрольного IgG антитела или только среду добавляли в лунку и оставляли для инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин. В зависимости от клеточной линии, каждую лунку, за исключением контрольных лунок, добавлены различные количества (2-15 мкл) очищенного комплемента кролика (cat #CL 3441 Cedarlane Laboratories, Канада). После инкубации в течение одного часа при 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. % СDС 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 таблице 1.

# ПРИМЕР 8: Исследования ADCC, индуцированные антителом $\kappa$ CD38

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) была оценена при помощи Daudi, MOLP-8 и RPMI-8226

клеточных линий в качестве клеток-мишеней. РВМС выделяли как эффекторные 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 образца И центрифугировали идп 1800 разбавленного (разбежка) в течение 25 мин. Отбиралась мутная промежуточная фаза, содержащая МКПК, промывалась 3 раза 2% FBS в PBS и замораживали аликвоты с концентрацией 50×106 клеток/мл на аликвоту в 10% DMSO/FBS. Замороженные аликвоты МКПК оттаивали и культивировали в течение ночи в 10% FBS/RPMI + рекомбинантного ИЛ-2 человека (R&D systems #202-IL) 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 3х 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 секунд при 800 грт, чтобы расположить все клетки в непосредственной близости. После 4 часов при 37°C планшеты центрифугировали при 1100 грт в течение 5 минут 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 минут при температуре. Люминесценцию считывали EnVision® (Perkin Elmer) люминесцентном планшет-ридере 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, и  $RLU_L$  - 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 таблице 1.

ТАБЛИЦА 1 CDC, ADCC и агонистичная активность ІдG-реформатированных антител

	CDC EC50	ADCC EC50	ADCC EC50	ADCC EC50	готпопА
Антитело	нМ	нМ	Мн	нМ (RPMI-	ЕС50 нМ
	(MOLP-8)	(DAUDI)	(MOLP-8)	8226)	(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	0,165±0,154	1,2±0,24	0,31
		данных			

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 разводили (в 2 раза) через лунки в двух 96-луночных планшетах в 1x 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 (2X молекулярная концентрация), используемых для титрации:

Тест-1, [mAb] сайт связывания = 50,8 нмоль -49,7 пмоль
Тест-2, [mAb] сайт связывания, е = 49,5 нмоль -48,3 пмоль
Аb 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 часов при 4°С, после чего планшеты промывали 3 раза при 4°C 1×PBS. Затем в каждую лунку добавляли 200 мкл 99 нмоль Су5 Fc-специфического поликлонального антитела козы к IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-175-008), И планшеты встряхивали в течение 30 минут при 4°С. Планшеты вновь промывали дважды при 4°C 1X PBS, затем был использован проточный цитометр FACSCanto™ II HTS для записи средней 5000 событий для каждой интенсивности флуоресценции (MFI) лунки, содержащей концентрацию уникального сайта связывания mAb. График средней интенсивности флуоресценции как функция концентрации антитела связывающего сайта антитела 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), Р (коэффициент пропорциональности, который соотносит произвольные единицы флуоресценции со связанным мAт), М (молярная клеточная концентрация; 0,553 фМ, основанная на 100000 клеток в 300 мкл), n (число рецепторов на клетку), В (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 таблице 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 (2X молекулярная концентрация) была использована для нелинейного проведения кривых по точкам.

# ПРИМЕР 10: Определение аффинности с использованием $Biacore \otimes$

Аффинности антител IgG к растворимому эктодомену CD38 (ECD) определяли при помощи анализа поверхностного плазмонного Biacore™ A100 резонанса (SPR) на приборе при Поликлональное антитело козы к IgG человека (Caltag H10500) CM5 биосенсорном чипе с использованием иммобилизовали на стандартного аминного связывания с точками 1, 2, 4 и 5 во всех четырех проточных кюветах в чипе. Уровни иммобилизация 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 4(11):2411-23 Science И Pace and Grimsley "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 конечной концентрации 100 фильтруемого BSA ДО мкг/мл. Все восемь очищенных тАв разводили подвижным буфером до приблизительно 2 мкг/мл. Предварительные концентрации эксперименты оценили количество каждого захватываемого mAb для поддерживания поверхностной емкости ( $R_{\text{max}}$ ) не более чем ~100 RU. Для каждого цикла захвата mAb/инъекции антигена mAb был захвачен В точках 1 И 5 В каждой проточной кювете 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 ПОТОКОМ последующим трехминутным ПОДВИЖНОГО буфера для стабилизации поверхности. HuCD38 вводили во все

проточные кюветы в течение 120 секунд при 30 мкл/мин в диапазоне концентраций от 193,7 нМоль - 3,0 нМоль (2х 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 пульсами 10 ммоль глицина, рН 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 таблице 2.

таблица 2

Антитело	FACS KD (HM) MOLP-8	FACS KD (πM) RPMI-8226	Biacore Ka (M-1c-1)	Biacore Kd (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 <b>,</b> 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  $5\times10^6$ , 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  $1\times10^6$  инкубировали в течение 3 или 6 часов 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 $^{\text{m}}$  II (BD Biosciences), либо визуализировали с использованием ImageXpress $^{\text{m}}$  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 Аb 19 и Ab 79. Сперва антитела были иммобилизованы при высокой и низкой плотностях на СМ5 чипах с использованием NHS/EDC связывающих реакций. Для каждого цикла эксперимента связывания эпитопа на эти поверхности вначале вносили CD38. Аналогично сэндвич-анализу в формате уникальное антитело (избранное из множества иммобилизованных антител) затем вносили на поверхности, содержащие комплексы СD38/антитело. Поверхности регенерировали с использованием пульсов фосфорной кислоты в конце каждого цикла. Данные были собраны при 22°C с использованием HBS-P (10 мМ HEPES10, рН 7,4, 150 мM NaCl, 0,005%) P-20) с добавлением BSA. Полученные сенсограммы обрабатывали с использованием модуля Mapping" пакета программного обеспечения Biacore® A100 Evaluation, а также пробной версии Scrubber для A100 для Для генерации двоичной 4×4 матрицы наборов данных. ДЛЯ вышеуказанных 4 моноклональных антител из двух отдельных данные, экспериментов были использованы дублирующие как показано в таблице 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 дессиминированной Daudi-люциферазной лимфомы человека. недельным самкам SCID CB.17 мышей из Taconic Laboratories внутривенно вводили концентрацию Daudi-Luc клеток равную  $1 \times 10^6$ . На 7 сутки исследования мышам внутрибрюшинно вводили: паливизумаб, Аb79, Ab19, Тест 1 и Тест 2. Начиная с 21-го дня еженедельно проводили биолюминесцентную визуализацию с использованием системы IVIS Xenogen (Caliper Life Sciences) контроля опухолевой массы. Для визуализации животным ДЛЯ 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 клетках после активации. Среди ПОКОЯЩИХСЯ МКПК нормальных доноров менее, чем 20% покояшихся клеток экспрессируют CD38 с количеством рецепторов примерно 10000-20000 на клетку. Активированные МКПК, также нормальных доноров, продемонстрировали 60-75% клеток, экспрессирующих CD38, c количеством рецепторов 110000 до 160000 на клетку.

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

иммуногистологически исследовали избыточной экспрессии CD38. 19 образцов от пациентов с СКВ были проанализированы, повышенная экспрессия CD38 наблюдалась на Bи Т-клетках памяти и плазмоцитоидных ДК. Были исследованы 3 PA, продемонстрировавшие инфильтрацию CD38плазматическими клетками синовиальной ткани У всех пациентов, а также повышенное окрашивание синовиальной ткани с Ab79. Выли исследованы 7 пациентов с болезнью Крона 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 СD38

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

Тем не менее, данные pK/pD демонстрируют выздоровление дозы. Как показано животных после введения на фиг. лимфоцитов становится аналогичным количество 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 IqG и общей выживаемости. CB17/HuSCID мышам вводили ASGM1 для истощения NK-клеток, а затем на другой день вводили МКПК человека. Период приживления составлял 7-10 дней, сыворотку отбирали для рандомизации Ід человека. На другой день мышам вводили восемь Ab79 в дозе 10 мг/кг с последующим введением TTd, со второй дозы через 4 дня, третьей дозой через три дня после этого, сыворотку собирали для подсчета Ιq человека И обнаружения противостолбнячного иммуноглобулина через 3 дня после этого (всего 10 дней от первой дозы). На фигуре 8 продемонстрированы результаты одной мыши-донора, которые указывают на значительное снижение всех Ід изотипов при лечении. На фигуре 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). фигуре 10 продемонстрировано На

значительное снижение противостолбнячного ответа при лечении Ab79. Наконец, на фигуре 11 продемонстрировано общее существенное выживания с использованием лечения Ab79.

#### Эксперименты на суррогатных мышах

Поскольку Аb79 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. фигуру 12), демонстрирующие, что биология заболевания различна. Таким образом, использование антител, перекрестно реагирующих с CD38 обезьяны, в моделях на обезьянах может дать значительно лучшие результаты.

Выло создано суррогатное антитело, демонстрирующее сходное истощение СD38+ клеток, полученных из селезенки, крови и костного мозга (данные не показаны), а также из периферической крови (см. фигуру 13). В дополнение к этому на фигуре 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 часов с более медленным истощением, продемонстрированном 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 T/B лимфоцитов, белок альбумина мочи и воспаление кожи. Конечное считывание В крови включает, не ограничивается: аутоантителами к двухцепочечной ДНК, CBC, FACS T/B лимфоцитов, из селезенки, лимфатических узлов и костного мозга: весом органов, количеством иммунных клеток, FACS T/B лимфоцитов, в почках: ДЛЯ весом гистопатологией (H&E и PAS), внутриклеточным расположением, клетками воспаления и воспалением кожи (гистопатологией).

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

Была использована мышиная модель с использованием

суррогатного антитела мыши с 7 группами мышей для оценки как про-профилактической, профилактической и терапевтической эффективности. Всех мышей иммунизировали CII/CFA на 0 день, бустер-инъекцией СІІ/СҒА на 21 день, как правило приводящие к 42 день (окончание прогрессированию заболевания с 21 по исследования). Группе 1 (10 мьшей) 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 3 мг/кг или 10 В дозе MF/KF qlw, 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)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNK
ILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNP
VSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGR
EDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

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

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQWSGSGTTS
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQTVPCN
KTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNN
PVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGG
REDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI

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)

QSYDSSLSGS

SEQ ID NO:9 (тяжелая цепь Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDISWNGGKT HYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:10 (легкая цепь Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL FPPSSEEL

SEO ID NO:11 (тяжелая цепь Ab19)

 ${\tt EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDK} \\ {\tt DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLVTVS} \\ {\tt SASTKGPSVFPLA}$ 

SEQ ID NO:12 (легкая цепь Ab19)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT LFPPSSEEL

SEQ ID NO:13 (HCDR1 Ab19)

GFTFNNYD

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)

QSYDSSLSGSR

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDK
DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTOKSLSLSPGK

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

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLS LTPEOWKSHRSYSCOVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:21 (тяжелая цепь Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDISWNGGKT
HYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:22 (легкая цепь Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:23 (CD157 Homo sapiens; NP 004325)

 ${\tt MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALL}$   ${\tt SPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFAD}$   ${\tt NTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTS}$ 

EDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIE IWVMHEIGGPNVESCGEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAA AATQRKAPSLYTEQRAGLIIPLFLVLASRTQL

SEQ ID NO:24 (Tect 1; вариабельная область тяжелой цепи)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTVS

SEQ ID NO:25 (Tect 1; вариабельная область легкой цепи)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:26 (Tect 2; вариабельная область тяжелой цепи)
QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDT
GYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:27 (Tect 2; вариабельная область легкой цепи)
DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGV
PDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIKR

SEO ID NO:28 (тяжелая цепь Ab43)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSRINSDGSST
SYADSMKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYYYYAMDVWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29 (легкая цепь Ab43)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGYKTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGLVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:30 (тяжелая цепь Ab72)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGST
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNYDFWSGYYYGMDVWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTOKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 (легкая цепь Ab72)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAARSTNIIFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:32 (тяжелая цепь Ab110)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIIYSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWGGATHDYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33 (легкая цепь Ab110)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGVLFGGGTKLTVLGQPKANPTVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDK
DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTOKSLSLSPGK

SEO 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. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с KD  $10^{-8}$  M или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

- 2. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где 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 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.

- 3. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и

- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где вариабельная 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 вариабельная 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.

- 4. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

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

- 5. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где вариабельная 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 вариабельная 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; и

где 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 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.

- 6. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где вариабельная 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 вариабельная 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; и

где антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с KD  $10^{-8}$  M или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

7. Выделенное антитело или его фрагмент, которое

специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:

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

одну или более сконструированных гликоформ;

где 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 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.

- 8. Выделенное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащее:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8, и

одну или более сконструированных гликоформ;

где антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с KD  $10^{-8}$  М или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

- 9. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 7 или 8, где сконструированная гликоформа включает гликозилирование одного или более полипептидов, и где гликозилирование представляет собой гликозилирование через N-связь или гликозилирование через О-связь.
  - 10. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 7 или 8,

где гликозилирование представляет собой гликозилирование через N-связь.

- 11. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 2-5 или 7, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека с KD  $10^{-8}$  M или большей аффинностью, и, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.
- 12. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1, 3, 4, 6 или 8, где 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 и SEQ ID NO: 2, на основе нумерации человеческой последовательности.
- 13. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1, 2, 7 или 8, в котором вариабельная 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/или вариабельная 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 любому из пп. 1-3 или 5-8, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
- 15. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-3 или 5-8, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
- 16. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:21, и/или легкая цепь содержит аминокислотную

последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEO ID NO:22.

- 17. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:9 и/или вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:10.
- 18. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:21 и/или легкая цепь содержит SEQ ID NO:22.
- 19. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-домен, где Fc-домен является Fc-доменом человека.
- 20. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, в котором Fc-домен представляет собой вариант Fc-домена человека.
- 21. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG человека.
- 22. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1 человека.
- 23. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-22 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель.
- 24. Композиция выделенной нуклеиновой кислоты, содержащая: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента,

где выделенное антитело или его фрагмент специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 25. Композиция выделенной нуклеиновой кислоты, содержащая: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента,

где выделенное антитело или его фрагмент специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержит:

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

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

26. Композиция выделенной нуклеиновой кислоты, содержащая: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента,

где выделенное антитело или его фрагмент специфично связывает CD38 человека CD38 (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), модержит:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

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

27. Композиция выделенной нуклеиновой кислоты, содержащая: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента,

где выделенное антитело или его фрагмент специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержит:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,

где антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с KD  $10^{-8}$  M или большей аффинностью, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.

- 28. Экспрессионный вектор, содержащий композицию нуклеиновой кислоты по любому из пп.24-27.
  - 29. Композиция экспрессионных векторов, содержащая: первый экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую

кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента; и

второй экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента,

где выделенное антитело или его фрагмент специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), включает:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 30. Клетка-хозяин, содержащая: композицию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 24-27, композицию экспрессионных векторов по п. 29, или экспрессионный вектор по п. 28.
- 31. Способ получения антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), включающий культивирование клетки-хозяина по п. 30, где продуцируется антитело или его фрагмент.
- 32. Способ получения антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), включающий включающий культивирование клетки-хозяина, включающей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:10; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:22,

где продуцируется антитело или его фрагмент.

33. Применение антитела или его фрагмента в производстве лекарственного средства для ингибирования биологической активности белка CD38 человека (SEQ ID NO:1) путем приведения белка в контакт с выделенным антителом или его фрагментом антитела, которое взаимодействует 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 связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2) и содержит:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 34. Применение антитела или его фрагмента в производстве лекарственного средства для истощения активированных клеток, экспрессирующих белок CD38 человека, представленный SEQ ID NO:1, путем контакта клеток с антителом или его фрагментом, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащего:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 35. Применение антитела или его фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения гематологического рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, выделенного

антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащего:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 36. Применение антитела или его фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека (SEQ ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащего:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 37. Применение антитела или его фрагмента в производстве лекарственного средства для диагностики аутоиммунного заболевания, демонстрирующего либо повышенную экспрессию CD38, экспрессирующих либо повышенное число клеток, CD38, компонента заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека (SEO ID NO:1) и CD38 яванского макака (SEQ ID NO:2), содержащего:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и

- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8.
- 38. Применение по п. 36 или 37, где 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.
- 39. Применение по п. 35, в котором гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, плазмаклеточного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта.
- 40. Применение по любому из пп. 33-37, в котором антитело или фрагмент антитела 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.
- 41. Применение по любому из пп. 33-37, в котором выделенное антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека с KD  $10^{-8}$  М или большей аффинностью, и, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.
- 42. Применение по любому из пп. 33-37, где вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

- 43. Применение по любому из пп. 33-37, где вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:9 и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:10.
- 44. Применение по любому из пп. 33-37, где вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:9 и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:10.
- 45. Применение по любому из пп. 33-37, где вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:9 и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:10.
- 46. Применение по любому из пп. 33-37, где вариабельная область выделенного тяжелой цепи антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:9 и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:10.
- 47. Применение по любому из пп. 33-37, где тяжелая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:21, и/или легкая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:22.
- 48. Применение по любому из пп. 33-37, где тяжелая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит SEQ ID NO:21

и/или легкая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит SEO ID NO:22.

- 49. Применение по п. 48, где выделенное антитело или его фрагмент представляет собой выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-22.
- 50. Способ лечения аутоиммунного заболевания, выбранного из группы, состоящей из ревматоидного артрита, системной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита и реакции трансплантат-против-хозяина, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека, представленного в SEQ ID NO:1, и CD38 яванского макака, представленного в SEQ ID NO:2, где выделенное антитело или его фрагмент содержит:
  - а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
  - ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
  - b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
  - i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
  - іі) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
  - iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,
- где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
- 51. Способ лечения гематологического рака, выбранного из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, плазмаклеточного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, в-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD38 человека, представленного в SEQ ID NO:1, и CD38 яванского макака, представленного в SEQ ID NO:2, где выделенное

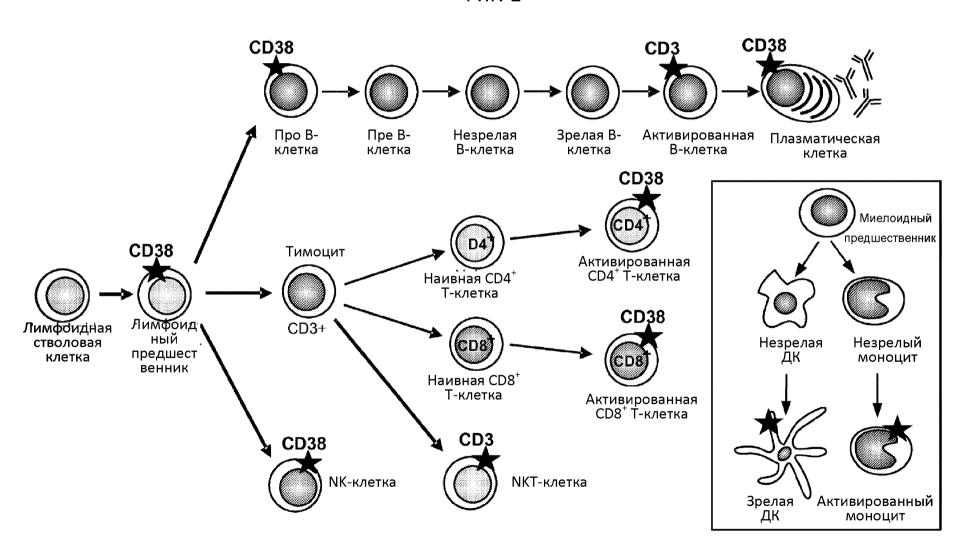
антитело или его фрагмент содержит:

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:
- i) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:3;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:4; и
- ііі) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:5; и
- b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:
- і) первый CDR, содержащий SEQ ID NO:6;
- ii) второй CDR, содержащий SEQ ID NO:7; и
- iii) третий CDR, содержащий SEQ ID NO:8,
- где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
- 52. Способ по п. 50 или 51, в котором 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.
- 53. Способ по п. 50 или 51, в котором выделенное антитело или его фрагмент связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 1) с KD  $10^{-8}$  М или большей аффинностью, и, где аффинность определена стандартным анализом Biacore.
- 54. Способ по п. 50 или 51, в котором вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 10.
- 55. Способ по п. 50 или 51, в котором вариабельная область тяжелой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и/или вариабельная область легкой цепи выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

- 56. Способ по п. 50 или 51, в котором тяжелая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:21, и/или легкая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO:22.
- 57. Способ по п. 50 или 51, в котором в котором тяжелая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит SEQ ID NO:21 и/или легкая цепь выделенного антитела или его фрагмента содержит SEQ ID NO:22.
- 58. Способ по п. 50 или 51, в котором выделенное антитело или его фрагмент представляет собой выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-22.

По доверенности

Фиг. 1



# Фиг. 2А

∡Тяжелая цепь Ab79 (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDIS WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH DSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь Ab79 (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLT VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS

Тяжелая цепь Ab19 (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## Фиг. 2В

Легкая цепь Ab19 (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKL TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS

## Фиг. 3

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

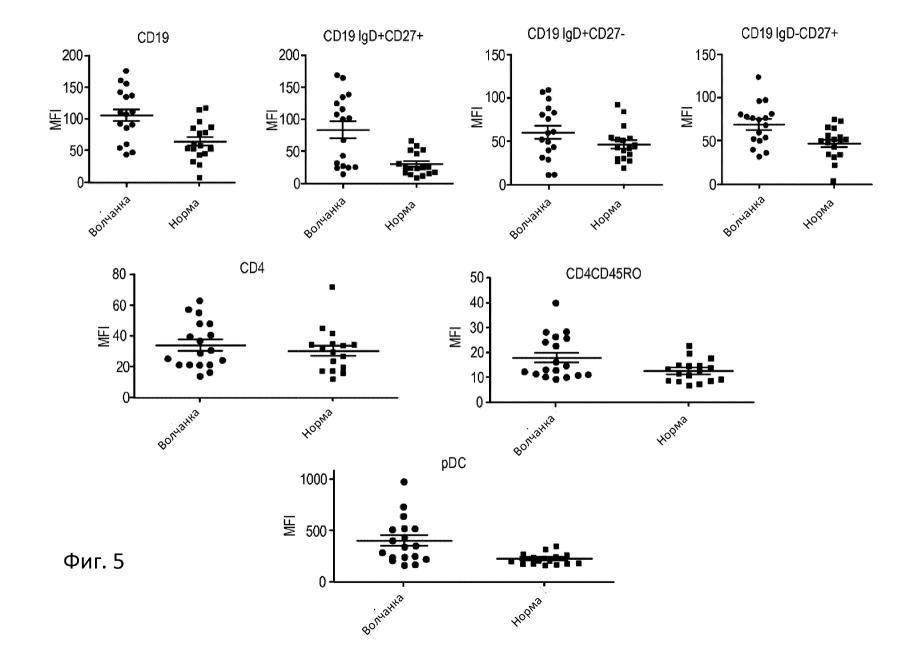
MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTKR FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQT VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCP DWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ PEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPE DSSCTSEI

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

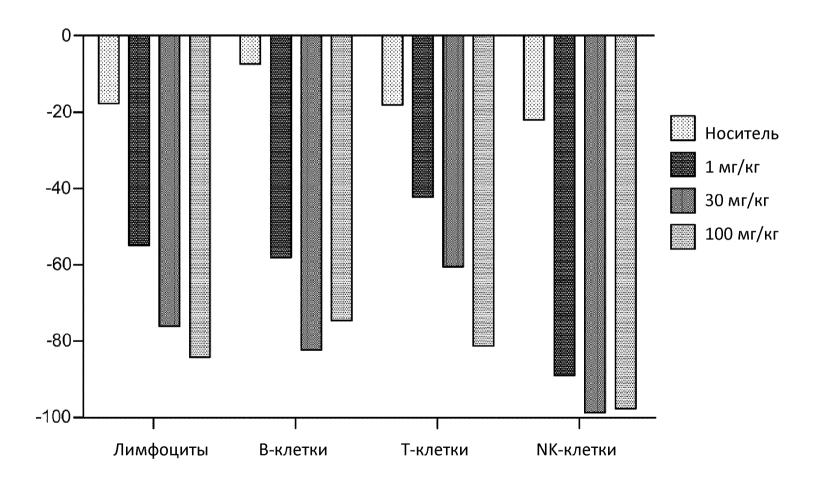
MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQWSGSGTTS RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQ TVPCNKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFNTFEINYQSC PDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNL QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN PEDSSCLSGI

Фиг. 4

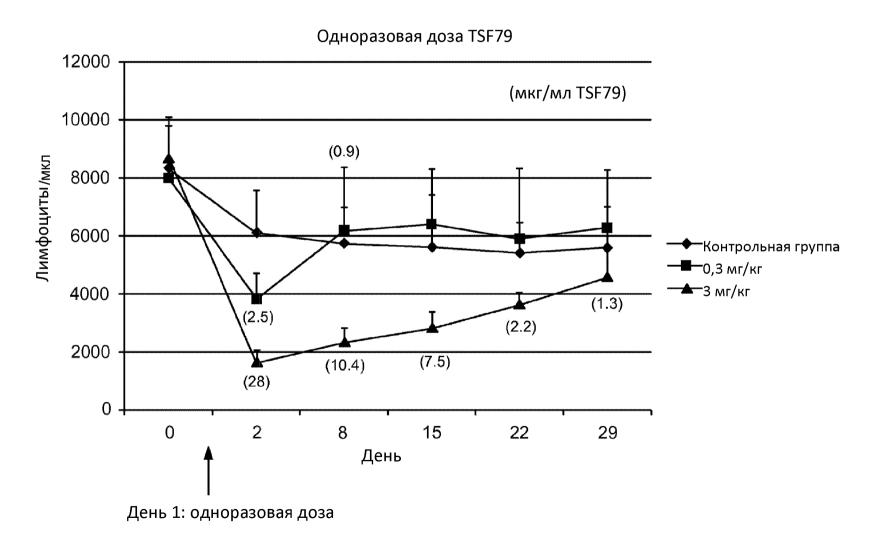
BM2		BM1		TSF19		TSF79	
E	76	N	120	G	91	К	121
Н	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
М	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	М	110	E	239
L	112	٧	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
Ť	114	Q	236	Q	115	С	275
Q	115	Ţ	237	Ť	148	K	276
Т	116	E	239	٧	192	F	284
٧	117	W	241	R	194	V	288
С	119	Q	272	R	195	К	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	Р	291
Т	191	C	275	А	199	E	292
٧	192	K	276	Н	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	Р	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
Ε	198	T	297	K	234		
Α	199	S	298				
Q	231						
E	233						
К	234						



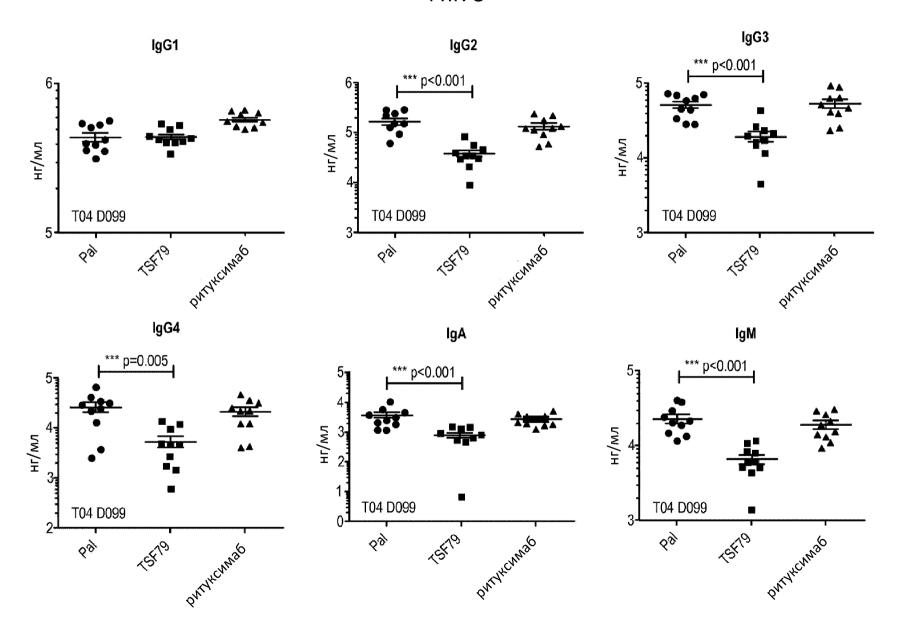
Фиг. 6



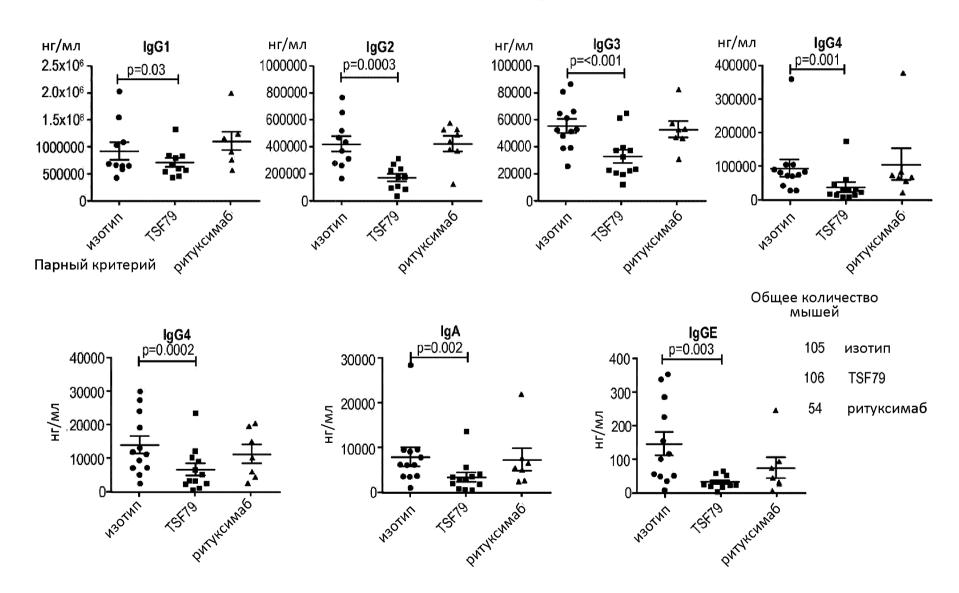
Фиг. 7



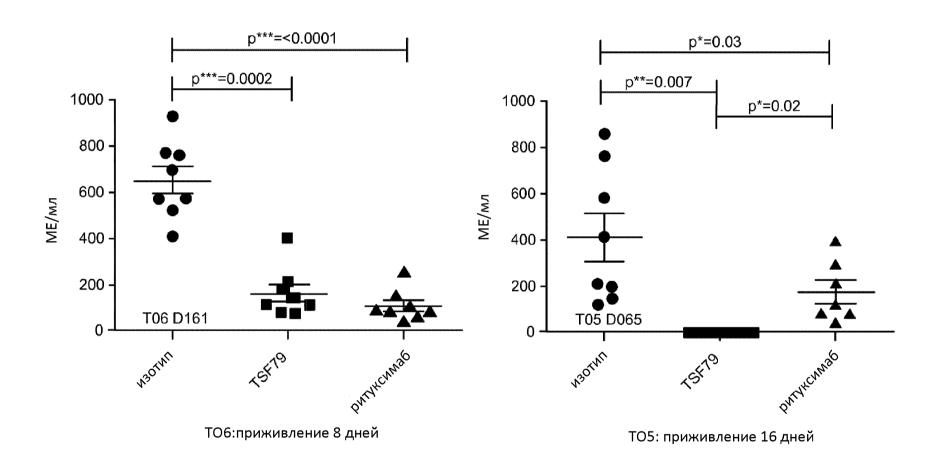
Фиг. 8



Фиг. 9

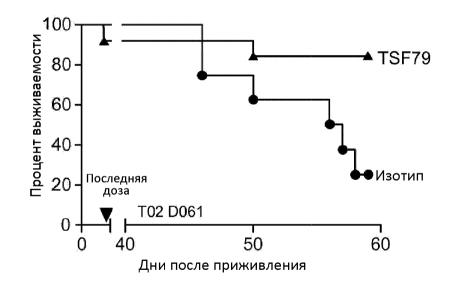


Фиг. 10

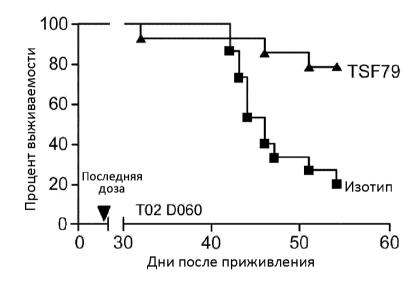


Фиг. 11

# Выживаемость

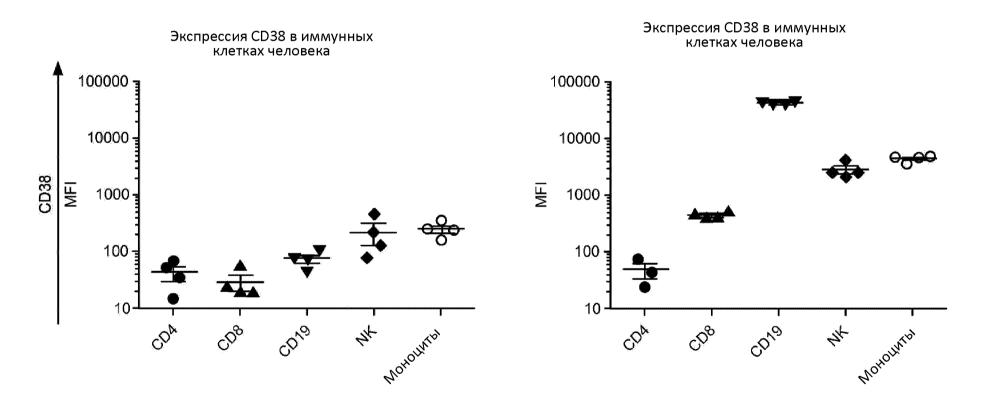


Лог-ранговый критерий Кокса-Мантеля: р=0.009

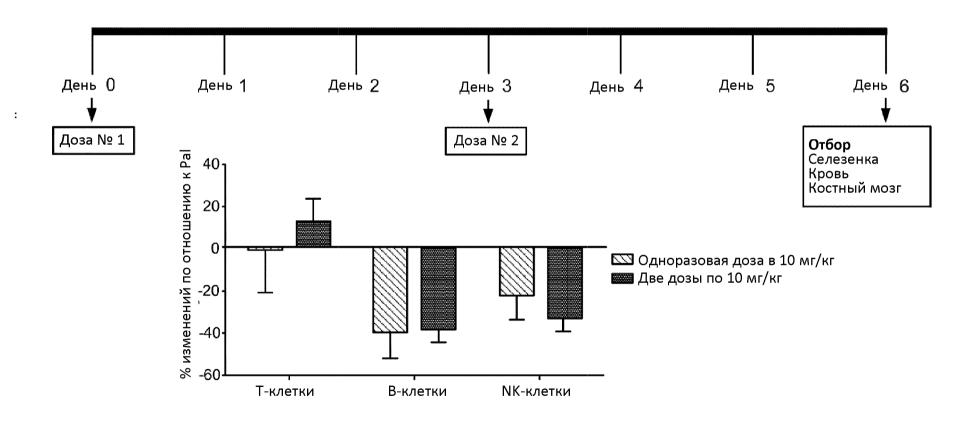


Лог-ранговый критерий Кокса-Мантеля \*\* p=0.0018

Фиг. 12



Фиг. 13



### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/068235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P35/02 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  $C07\,K$ 

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of	Relevant to claim No.				
X	WO 2006/125640 A2 (MORPHOSYS TESAR MICHAEL [DE]) 30 November 2006 (2006-11-30) pp. 32, 45-48; 54-56examples tables 5, 9-12	1-20				
	LITTLE M ET AL: "Of mice and hybridoma and recombinant ant IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PU CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000, pages 364-370, XP004215163, ISSN: 0167-5699, DOI: 10.1016/S0167-5699(00)01668-6 page 367; figure 3	14,15				
X Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	X See patent family annex				
Special ca  A" documer conside E" earlier de filing de documer which is citation O" documer later the	ategories of cited documents:  Int defining the general state of the art which is not sered to be of particular relevance coument but published on or after the international ate in the state of the st	"T" later document published afte or priority date and not in co ofted to understand the princinvention  "X" document of particular releva cannot be considered novel involve an inventive step wh  "Y" document of particular releva cannot be considered to involve an inventive step wh  "Y" document of particular releva cannot be considered to involve an inventive step which was a successful to the considered to involve and the considered to involve and the combination be in the art.	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled			
	ctual completion of the international search  March 2012		Date of mailing of the international search report  02/05/2012  Authorized officer  Bernhardt, Wiebke			
	ailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer				

## **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/US2011/068235

ategory*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Dalayantha (Life No.
	WO 2006/099875 A1 (GENMAB AS [DK]; WEERS MICHEL DE [NL]; GRAUS YVO [NL]; OPRINS	Relevant to claim No.
	JUDITH [N) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document sequences 12, 17	
	PARK PETER U ET AL: "SAR650984: A Potent Anti-CD38 Therapeutic Antibody with Three Mechanisms of Action (Apoptosis, ADCC, CDC) for Hematological Malignancies.", BL00D, 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	1-20
	KONG SUN-YOUNG ET AL: "Daratumumab Directly Induces Human Multiple Myeloma Cell Death and Acts Synergistically with Conventional and Novel Anti-Myeloma Drugs", BLOOD,	1-20
	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	1-20
·		

## **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/068235

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
	WO 2006125640	A2 30-11-2006	AR	053489	A1	09-05-2007	
				EP	1888647	A2	20-02-2008
				US	2009123950	A1	14-05-2009
				WO	2006125640	A2	30-11-2006
	WO 2006099875	A1	28-09-2006	AU	2006226733	A1	28-09-2006
				CA	2602375	A1	28-09-2006
				EA	200702053	A1	28-02-2008
				EP	1866338	A1	19-12-2007
				JP	2008533977	Α	28-08-2008
				KR	20070116137	A	06-12-2007
				US	2009148449	A1	11-06-2009
				US	2011099647	A1	28-04-2011
				WO	2006099875	A1	28-09-2006