



УКРАЇНА

(19) UA (11) 120748 (13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21)	Номер заявки:	а 2016 05765	(73)	Власник(и):	САНОФІ, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris, France (FR)
(22)	Дата подання заявки:	31.10.2014	(74)	Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.02.2020	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	CHILLEMI ANTONELLA et al. Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the functional characteristics of the target molecule. Molecular medicine (Cambridge, mass.), 2013, Vol. 19, P. 99 – 108 MARTIN THOMAS G III et al. SAR650984, a CD38 monoclonal antibody in patients with selected CD38+hematological malignancies- data from a dose-escalation phase I study. Blood, & 55th annual meeting of the american-society-of-hematology; New Orleans, LA, USA; december 07 -10, 2013, Vol. 122, no. 21, P. 284 MARTIN T. et al. A phase ib dose escalation trial of SAR650984 (ANTI-CD-38 mab) in combination with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. Haematologica, & 19TH congress of the european-hematology-association; Milan, Italy; june 12 - 15, 2014, Vol. 99, no. Suppl. 1, P. 114 GOPALAKRISHNAN S. et al. Daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multidrug therapies. Blood and lymphatic cancer: targets and therapy, 20130107 DOVE MEDICAL PRESS LTD. NZL, Vol. 3, P. 19 – 24 RICHARDSON P. et al. Daratumumab. Anti-CD38 monoclonal antibody, treatment of multiple myeloma. Drugs of the future 2013 prous science esp, 2013, Vol. 38, no. 8, P. 545 – 554 Sanofi. Dose escalation study of anti-CD38 monoclonal antibody in patients with selected CD38+ hematological malignancies, 2013, ClinicalTrials.gov archive, [Інтернет публікація] URL: <a href="https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01084252/2013_10_15">https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01084252/2013_10_15</a> (знайдено 30.01.2015) HENK LOKHORST et. al. DARATUMUMAB, a CD38 monoclonal antibody study in advanced multiple myeloma – data from a dose escalation followed by open-label extension in a single-arm phase I/II study. [Інтернет публікація] retrieved from the internet: <a href="http://static9.light-kr.com/documents/Plesner%20-%20ASH%202012%20-%20Daratumumab.pdf">http://static9.light-kr.com/documents/Plesner%20-%20ASH%202012%20-%20Daratumumab.pdf</a> (знайдено 08.11.2017) WO 2013059885 A2, 02.05.2013 WO 2008047242 A2, 24.04.2008
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/898,309, 14306220.6			
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	31.10.2013, 31.07.2014			
(33)	Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, EP			
(41)	Публікація відомостей про заявку:	10.10.2016, Бюл.№ 19			
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.02.2020, Бюл.№ 3			
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/063380, 31.10.2014			
(72)	Винахідник(и):	Десланд Антуан (US), Грзегорзевскі Крзизтоф Дж. (US), Озу Марі-лор (US), Томкінсон Блейк (US)			

**(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ СУБ'ЄКТА-ЛЮДИНИ З РЕЦИДИВНОЮ І/АБО РЕЗИСТЕНТНОЮ МНОЖИННОЮ МІЕЛОМОЮ, АНТИТІЛОМ, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄ CD38**

(57) Реферат:

UA 120748 C2

Винахід належить до способу лікування суб'єкта-людини з рецидивною і/або резистентною множинною мієломою, який передбачає введення суб'єкту-людині антитіла, що специфічно зв'язує CD38, де зазначене антитіло здатне вбивати клітини CD38+ у суб'єкта-людини шляхом індукції апоптозу, антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) та комплемент-залежної цитотоксичності (CDC).

## СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 61/898309, поданою 31 жовтня 2013 року, та заявкою на європейський патент № EP14306220.6, поданою 31 липня 2014 року, обидві з яких включено в дану заявку за допомогою посилання в їхній повноті та для усіх цілей.

## Перелік послідовностей

Дана заявка супроводжується переліком послідовностей у машинопрочитуваній формі, який точно відтворює послідовності, описані в даному документі.

## Галузь винаходу

Дане розкриття стосується лікування захворювань із застосуванням антитіл. Більш конкретно, воно пов'язане із застосуванням антитіл до CD38 як лікарського препарату або в одержанні лікарського препарату для лікування форм раку, таких як множинна мієлома.

## Передумови винаходу

CD38 являє собою 45 кДа трансмембранний глікопротеїн II типу з довгим С-термінальним позаклітинним доменом та коротким N-термінальним цитоплазматичним доменом. Білок CD38 являє собою біфункціональний ектофермент, який може каталізувати перетворення НАД<sup>+</sup> у циклічну АДФ-рибозу (цАДФР) та також гідролізує цАДФР до АДФ-рибози.

Експресія CD38 підвищена в багатьох гематологічних злоякісних новоутвореннях та в клітинних лініях, що походять від різних гематологічних злоякісних новоутворень. При цьому, найбільш примітивні плюрипотентні стовбурові клітини гематологічної системи є CD38<sup>+</sup>. Експресія CD38 у гематологічних злоякісних новоутвореннях та його зв'язок із прогресуванням захворювання при хронічному лімфоцитарному лейкозі (CLL) робить CD38 привабливою мішенню для терапії антитілами.

Антитіла до CD38, які специфічно розпізнають CD38, були описані раніше, наприклад, у міжнародній патентній заявці WO2006/099875. Проте ці антитіла не могли індукувати апоптоз, якщо їх застосовували як монотерапевтичний засіб та інкубували з клітинами, що експресують CD38<sup>+</sup>.

Специфічні моноклональні антитіла до CD38, такі як 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 та 38SB39, були описані раніше в міжнародній патентній заявці WO2008/047242. В WO2008/047242 описані три цитотоксичні активності, апоптоз, ADCC та CDC, цих специфічних антитіл до CD38.

До того ж, про застосування цих специфічних антитіл до CD38<sup>+</sup> у комбінації з цитотоксичними засобами, такими як цитарабін, вінкрисин, циклофосфамід та мелфалан, повідомлялося у міжнародних патентних заявках WO2010/061357, WO2010/061358, WO2010/061359 та WO2010/061360. Проте про застосування антитіла до CD38 як монотерапевтичного засобу не повідомлялося.

## Короткий опис винаходу

В одному варіанті здійснення дане розкриття пов'язане з антитілом, що специфічно зв'язує CD38, для застосування як лікарського препарату, де антитіло має вводитися суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі 20 мг/кг або менше.

В іншому варіанті здійснення безпечна терапевтична доза розкритого антитіла становить приблизно 5 мг/кг, або приблизно 10 мг/кг, або приблизно 20 мг/кг.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття також пов'язане з антитілом, що специфічно зв'язує CD38, або фармацевтичною композицією, яка містить антитіло, що специфічно зв'язує CD38, де антитіло або фармацевтичну композицію можна застосовувати як лікарський препарат у лікуванні рецидивної і/або резистентної множинної мієломи, де антитіло має вводитися суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі приблизно 20 мг/кг або менше.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття також пов'язане із застосуванням антитіла до CD38 як монотерапевтичного засобу, що зменшує призначувані пацієнту хімотерапевтичні засоби.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття додатково пов'язане з безпечною для суб'єкта-людини терапевтичною дозою антитіла, що специфічно зв'язує CD38, де зазначена безпечна терапевтична доза становить 20 мг/кг або менше, або приблизно 20 мг/кг або менше.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття також стосується способу лікування CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення в суб'єкта-людини, що потребує цього, при цьому зазначений спосіб передбачає введення зазначеному суб'єкту-людині антитіла, що специфічно зв'язує CD38 при безпечній терапевтично ефективній кількості 20 мг/кг або менше, або приблизно 20 мг/кг або менше.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття також стосується способу лікування CD38<sup>+</sup> множинної мієломи в суб'єкта-людини, що потребує цього, при цьому зазначений спосіб

передбачає введення зазначеному суб'єкту-людині ефективної кількості антитіла, що специфічно зв'язує CD38.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття також стосується застосування зазначеного антитіла, що специфічно зв'язує CD38, для виробництва лікарського препарату, де зазначене антитіло вводиться суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі 20 мг/кг або менше, або приблизно 20 мг/кг або менше.

В одному варіанті здійснення лікарський препарат призначений для лікування CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, конкретно, множинної мієломи, найбільш конкретно, рецидивної і/або резистентної CD38<sup>+</sup> множинної мієломи.

В іншому варіанті здійснення дане розкриття додатково стосується застосування зазначеного антитіла, що специфічно зв'язує CD38, для виробництва лікарського препарату для лікування CD38<sup>+</sup> множинної мієломи, конкретно, рецидивної і/або резистентної CD38<sup>+</sup> множинної мієломи.

В одному варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент не запускають продукування аутоантитіл проти зазначеного антитіла або епітоп-зв'язувального фрагмента в суб'єкті-людині, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент вводяться суб'єкту-людині з дозою приблизно 20 мг/кг або менше.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент здатні проявляти виявлювану зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 1 мг/кг кожні два тижні.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент здатні проявляти щонайменше приблизно 84,1 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині рівня дози приблизно 10 мг/кг кожні два тижні.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент здатні проявляти щонайменше приблизно 97,7 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині рівня дози приблизно 10 мг/кг кожні два тижні.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент здатні до інгібування росту пухлини в суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 5 мг/кг до приблизно 20 мг/кг кожні два тижні або щотижня.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його епітоп-зв'язувальний фрагмент, що здатні до специфічного зв'язування CD38, розкриті для застосування як лікарського препарату, де антитіло або епітоп-зв'язувальний фрагмент здатні до інгібування росту пухлини в суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 10 мг/кг до приблизно 20 мг/кг кожні два тижні або щотижня.

В іншому варіанті здійснення також розкрита фармацевтична композиція, що містить будь-яке з розкритих антитіл та фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

В іншому варіанті здійснення в даному розкритті передбачена одинична лікарська форма, що містить фармацевтичну композицію, розкриту в даному документі.

В іншому варіанті здійснення в даному розкритті також передбачений продукт виробництва, що містить фармацевтичну композицію, розкриту в даному документі, та контейнер.

В іншому варіанті здійснення розкриті способи можуть бути придатними для лікування суб'єкта-людини із захворюванням або порушенням, за яких аномально підвищена експресія CD38. Такі способи можуть включати, крім інших стадій, введення суб'єкту-людині антитіла або його епітоп-зв'язувального фрагменту, що здатні до специфічного зв'язування CD38, де антитіло здатне до інгібування росту пухлини у суб'єкта-людини при введенні суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг кожні два тижні або щотижня. В одному аспекті таке захворювання або порушення являє собою CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення. В іншому аспекті таке захворювання або порушення являє собою CD38<sup>+</sup> множинну мієлому.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Графік, що показує відповідь залежно від часу в пацієнтів із множинною мієломою (N=17), яких лікували за допомогою специфічного антитіла до CD38, hu38SB19, з різними дозами (1, 3, 5 та 10 мг/кг). (Деяких пацієнтів було виключено після короткого періоду лікування через прогресуюче захворювання. Проте в деяких пацієнтів спостерігали стабілізацію під час лікування, а в інших за рівнів дози 1 мг/кг та 10 мг/кг спостерігали часткову відповідь. PR= часткова відповідь, MR= мінімальна відповідь, SD= стабільне захворювання або PD= прогресуюче захворювання).

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

У контексті даного розкриття терміном "CD38" називають білок CD38, що являє собою 45 кДа трансмембранний глікопротеїн II типу з довгим С-термінальним позаклітинним доменом та коротким N-термінальним цитоплазматичним доменом. Білок CD38 являє собою біфункціональний ектофермент, який може каталізувати перетворення НАД<sup>+</sup> у циклічну АДФ-рибозу (цАДФР) та також гідролізує цАДФР до АДФ-рибози. Протягом онтогенезу CD38 з'являється на CD34<sup>+</sup> комітованих стовбурових клітинах та комітованих за лінією диференціювання клітинах-попередниках лімфоїдних, еритроїдних та мієлоїдних клітин. Експресія CD38 зберігається переважно у лімфоїдній лінії диференціювання з перемінними рівнями експресії на різних стадіях розвитку Т- та В-клітин.

Роль CD38<sup>+</sup> у передаванні сигналу була додатково описана у міжнародній патентній заявці WO2008/047242. Конкретно, CD38 називають трансмембранний білок II типу, що містить, наприклад, амінокислотну послідовність, яка розміщена під номером доступу Genbank NP\_001766.2 (доступну на 7 жовтня 2013 року).

Експресія CD38 підвищена в багатьох гематологічних злоякісних новоутвореннях та в клітинних лініях, що походять від різних гематологічних злоякісних новоутворень.

"Гематологічні злоякісні новоутворення" являють собою типи раку, які уражають кров, кістковий мозок та лімфатичні вузли. Оскільки всі три безпосередньо пов'язані завдяки імунній системі, захворювання, що уражає одне з цих трьох, також може вражати решту. Гематологічні злоякісні новоутворення включають неходжкінську лімфому (NHL) (у тому числі, наприклад, лімфому Беркітта (BL) та Т-клітинну лімфому (TCL)), множинну мієлому (MM), хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL) (такий як, наприклад, В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз (B-CLL) та волосатоклітинний лейкоз (HCL)), В- та Т-клітинний гострий лімфоцитарний лейкоз (ALL), гострий мієлоїдний лейкоз (AML), лімфому Ходжкіна (HL) та хронічний мієлоїдний лейкоз (CML).

З іншого боку, найбільш примітивні плюрипотентні стовбурові клітини гематологічної системи є CD38<sup>-</sup>. Експресія CD38 у гематологічних злоякісних новоутвореннях та його зв'язок із прогресуванням захворювання робить CD38 привабливою мішенню для терапії антитілами.

"CD38<sup>+</sup> клітина" являє собою клітину, що експресує білок CD38. Зокрема, CD38<sup>+</sup> клітина являє собою клітину ссавця. В одному варіанті здійснення CD38<sup>+</sup> клітина являє собою клітину неходжкінської лімфому (NHL), множинної мієломи (MM), хронічного лімфоцитарного лейкозу (CLL), В- та Т-клітинного гострого лімфоцитарного лейкозу (ALL), гострого мієлоїдного лейкозу (AML), лімфому Ходжкіна (HL), або хронічного мієлоїдного лейкозу (CML), що експресує білок CD38.

"CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення", таким чином, являє собою гематологічне злоякісне новоутворення, описане вище, де ракові клітини являють собою CD38<sup>+</sup> клітини або включають їх.

У контексті даного розкриття CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення, зокрема, вибрано з групи, що складається з неходжкінської лімфому (NHL) (у тому числі, наприклад, лімфому Беркітта (BL) та Т-клітинної лімфому (TCL)), множинної мієломи (MM), хронічного лімфоцитарного лейкозу (CLL) (такого як, наприклад, В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз (B-CLL) або волосатоклітинний лейкоз (HCL)), В- та Т-клітинного гострого лімфоцитарного лейкозу (ALL), гострого мієлоїдного лейкозу (AML), лімфому Ходжкіна (HL) та хронічного мієлоїдного лейкозу (CML), де ракові клітини являють собою CD38<sup>+</sup> клітини або включають їх.

Конкретно, CD38<sup>+</sup> гематологічні злоякісні новоутворення являють собою В-клітинну неходжкінську лімфому (NHL), множинну мієлому (MM), гострий мієлоїдний лейкоз (AML), гострий лімфобластний лейкоз (В-клітинний ALL) і/або хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), більш конкретно, множинну мієлому (MM), найбільш конкретно, рецидивну і/або резистентну множинну мієлому.

Способи виявлення гематологічного злоякісного новоутворення відомі фахівцю в даній галузі та включають як першу стадію повний аналіз крові (CBC) та дослідження мазка периферичної крові. Для визначення остаточного діагнозу, звичайно, потрібна задовільна

пункція кісткового мозку і/або біопсія для морфологічних досліджень, які, врешті-решт, доповнюються аналізом проточної цитометрії, цитогенетикою та додатковими молекулярними методиками.

5 Методики для підтвердження того, що клітини, які походять з цього гематологічного злоякісного новоутворення, є CD38<sup>+</sup> відомі фахівцю в даній галузі та включають стандартні методики молекулярної біології, такі як, наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (PCR), і/або імунохімічні способи, такі як вестерн-блот аналіз.

У контексті даного розкриття "суб'єкт" позначає людину.

10 Зокрема, "суб'єкт" і/або "суб'єкт, що потребує цього" позначає в даному документі індивіда, що уражений CD38<sup>+</sup> гематологічним злоякісним новоутворенням та одержує медичну допомогу або лікування. Словом "суб'єкт", таким чином, може називатися в даному документі пацієнт.

Суб'єктом згідно з даним розкриттям може бути чоловік або жінка.

15 У деяких варіантах здійснення суб'єкт попередньо проходив лікування за допомогою протиракової терапії. Конкретно кажучи, зазначена попередня протиракова терапія може бути вибрана з групи, яку складають хіміотерапія, засоби цілеспрямованої терапії раку, радіотерапія, трансплантація кісткового мозку і/або стовбурових клітин та імунотерапія.

"Хіміотерапією" називають лікування раку за допомогою одного або декількох цитотоксичних протипухлинних лікарських засобів (хіміотерапевтичних лікарських засобів) як частини стандартних схем. Хіміотерапевтичний лікарський засіб звичайно призначають циклами, де за 20 періодом лікування йде період відпочинку, щоб надати організму час на відновлення.

"Хіміотерапевтичні лікарські засоби", які застосовують, наприклад, для лікування гематологічного злоякісного новоутворення, являють собою без виключення цитарабін (цитозин-арабінозид або ara-C) та антрациклінові лікарські засоби (такі як даунорубіцин і/або дауноміцин, доксорубіцин та ліпосомальний доксорубіцин, ідарубіцин та мітоксантрон), 25 гемтузумаб, клофарабін, кладрибін, гідроксисечовину (hydrea®), етопозид, амсакрин, FLT3-інгібітори та деметилуючі засоби (5-азацитидін та децитабін), мелфалан, циклофосфамід, вінкрестин, інгібітори протеасом, такі як бортезоміб, леналідомід, талідомід і/або помалідомід, конкретно, бортезоміб і/або леналідомід.

"Засобами цілеспрямованої терапії раку" називають лікарські засоби або інші речовини, що 30 блокують ріст та розповсюдження раку шляхом створення перешкод для специфічних молекул, що залучені у ріст та прогресування пухлини.

"Радіаційна терапія" або "опромінення" використовує випромінювання з високою енергією для видалення ракових клітин. Радіаційну терапію слід застосовувати перед трансплантацією кісткового мозку або стовбурових клітин периферичної крові.

35 "Трансплантацією кісткового мозку і/або стовбурових клітин" називають трансплантацію клітин для відновлення стовбурових клітин, які були знищені високими дозами хіміотерапії і/або радіаційної терапії. Джерела стовбурових клітин включають кістковий мозок, периферичну кров або пуповинну кров. Залежно від джерела стовбурових клітин, які трансплантують, процедуру можна розділяти на трансплантацію кісткового мозку (BMT), або трансплантацію стовбурових 40 клітин периферичної крові (PBSCT), або трансплантацію пуповинної крові (UCBT). Крім того, трансплантацією кісткового мозку і/або стовбурових клітин може називатися аутологічна трансплантація стовбурових клітин і/або алогенна трансплантація.

У разі "аутологічної трансплантації" власні стовбурові клітини суб'єкта вилучають з його або її кісткового мозку або периферичної крові. Їх заморожують та зберігають, поки особа одержує 45 лікування (високодозову хіміотерапію і/або опромінення). Спосіб під назвою "очищення" можна застосовувати при спробі видалити будь-які лейкозні клітини зі зразків. Стовбурові клітини потім реінфузують у кров суб'єкта після лікування.

"Алогенні трансплантати" являють собою трансплантати від сумісного донора. Перевагою алогенних трансплантатів кісткового мозку є те, що трансплантовані клітини від донора можуть 50 створювати нову імунну систему, яка зможе визначати лейкозні клітини як чужорідні та видаляти їх. Недоліком алогенних трансплантатів є обмежена кількість сумісних донорів та побічні ефекти.

"Імунотерапією" називають стимулювання імунної системи суб'єкта для агресивного впливу на клітини злоякісної пухлини, які відповідальні за захворювання. Це можна здійснювати або за 55 допомогою імунізації суб'єкта, наприклад, шляхом введення протиракової вакцини, у цьому випадку власна імунна система суб'єкта тренується для розпізнавання клітин пухлини як мішеней, що підлягають знищенню, або за допомогою введення терапевтичних антитіл як лікарських засобів, у цьому випадку імунна система суб'єкта залучається до знищення клітин пухлини за допомогою терапевтичних антитіл.

60 У контексті даного розкриття суб'єкт міг попередньо проходити лікування проти

гематологічного злоякісного новоутворення за допомогою стандартної протиракової терапії, як визначено вище, але в якого мав місце рецидив і/або резистентність.

Таким чином, у конкретному варіанті здійснення суб'єкт страждає на CD38<sup>+</sup> множинну мієлому, конкретно на рецидивну і/або резистентну CD38<sup>+</sup> множинну мієлому.

5 "З рецидивом" називають суб'єкта, який вже проходив лікування щодо гематологічного злоякісного новоутворення та в якого спостерігалось поліпшення, але в якого гематологічне злоякісне новоутворення повернулося знову.

"З резистентністю" називають суб'єкта, який вже проходив лікування щодо гематологічного злоякісного новоутворення без будь-якого поліпшення, та гематологічне злоякісне новоутворення, таким чином, прогресувало.

10 В одному варіанті здійснення суб'єкт попередньо проходив лікування бортезомібом і/або леналідомідом.

В одному варіанті здійснення суб'єкт попередньо отримав аутологічний трансплантат стовбурових клітин (ASCT).

15 В одному варіанті здійснення суб'єкт мав рецидив не пізніше 6 місяців після аутологічної трансплантації.

З рівня техніки відомо, що в суб'єктів, що мають множинну мієлому, певні генетичні ознаки, такі як хромосомна делеція 17p, транслокації t (4, 14), t (14, 16), t (14, 20) або ампліфікації, такі як >3 копій 1q21, асоційовані з більш несприятливим наслідком.

20 Отже, в одному варіанті здійснення суб'єкт має делецію 17p, t (4, 14), t (14, 16), t (14, 20) і/або >3 копій 1q21.

Останнім часом, дослідники розробили тест з геномним профілюванням для суб'єктів з множинною мієломою. Цей тест дозволяє лікарям класифікувати суб'єктів з множинною мієломою на основі їхнього геномного профілю експресії, а не лише на деяких хромосомних аномаліях.

25 В одному варіанті здійснення суб'єкт, таким чином, може мати сигнатуру профілювання генної експресії (GEP) високого ризику (Shaughnessy JD Jr., Zhan F, Burington BE, et al. (2007), Blood 109: 2276–2284.).

У суб'єкта можна спостерігати будь-яку комбінацію згаданих вище ознак.

30 Множинну мієлому можна виявляти за наявністю моноклональних білків (М-білків).

"М-білком" називають парапротеїн (моноклональний білок або М білок). Цей парапротеїн являє собою імуноглобулін або легкий ланцюг імуноглобуліну, який надлишково продукується внаслідок клональної проліферації плазматичних клітин. Кількості, що перевищують певний пороговий рівень, вказують на множинну мієлому. М-білок, як правило, кількісно визначають у сироватці, а також у сечі.

35 Рівень М-білка у сироватці вимірюють, як правило, за допомогою електрофорезу сироватки, або за допомогою, наприклад, аналізів на специфічні імуноглобуліни; проте кількісне визначення специфічних імуноглобулінів завжди переоцінює М-білок, оскільки нормальні імуноглобуліни включені в результат. Через це, вимірювання вихідного рівня та подальші вимірювання М-білка слід виконувати за допомогою одного способу (Riches PG et al., 1991).

40 В одному варіанті здійснення рівень М-білка у сироватці >0,5 г/дл вказує на множинну мієлому. В іншому варіанті здійснення рівень М-білка у сироватці більше ніж приблизно 0,5 г/дл вказує на множинну мієлому.

М-білком у сечі називають М-білок, який виводиться у сечі, що досліджують протягом 24 годин. Як правило, вимірюють загальну кількість білка, що виводиться за 24 години, та множать на значення відсотку М-білка в сечі, яку визначають за допомогою електрофорезу концентрованого білка сечі.

В одному варіанті здійснення рівень М-білка у сечі >200 мг у 24-годинній сечі вказує на множинну мієлому. В іншому варіанті здійснення рівень М-білка у сечі більше ніж приблизно 200

50 мг у 24-годинній сечі вказує на множинну мієлому.

Множинну мієлому можна додатково виявляти за допомогою легкого ланцюга імуноглобуліну, який виявляють у сечі, цей парапротеїн має назву білок Бенс-Джонса та являє собою парапротеїн сечі, що складається з вільних легких ланцюгів, де ці легкі ланцюги являють собою вільні легкі ланцюги лямбда (λ) і/або каппа (κ). Ці вільні легкі ланцюги (FLC) можна вимірювати за допомогою комерційних тестів. Вимірюванням вільних легких ланцюгів називають вимірювання вільних легких ланцюгів FLC-каппа та FLC-лямбда, що дає співвідношення вільних легких ланцюгів (FLC) FLC-каппа до FLC-лямбда (співвідношення FLC κ/λ), де нормальне співвідношення FLC κ/λ перебуває в діапазоні від 0,26 до 1,65.

60 У пацієнтів із множинною мієломою може переважно продукуватися один з легких ланцюгів, каппа або лямбда, що веде до змін у співвідношенні FLC κ/λ.

Аномальні співвідношення FLC к/л, що вказують на множинну мієлому, являють собою, таким чином, співвідношення FLC к/л  $<0,26$  або  $>1,65$ .

В одному варіанті здійснення підвищений рівень вільних легких ланцюгів (FLC) у сироватці, FLC  $>10$  мг/дл, та аномальне співвідношення FLC вказують на множинну мієлому. В іншому варіанті здійснення підвищений рівень вільних легких ланцюгів (FLC) у сироватці, FLC більше ніж приблизно 10 мг/дл, та аномальне співвідношення FLC вказують на множинну мієлому.

Отже, в одному варіанті здійснення суб'єкт з множинною мієломою має а) вимірюваний рівень М-білка у сироватці більше ніж приблизно 0,5 г/дл, і/або б) рівень М-білка у сечі більше ніж приблизно 200 мг (24-годинна сеча), і/або с) підвищений рівень вільних легких ланцюгів (FLC) у сечі, FLC більше ніж приблизно 10 мг/дл, з аномальним співвідношенням FLC.

В одному варіанті здійснення суб'єкт є толерантним до інфузованих білкових продуктів.

У контексті даного розкриття антитіло специфічно зв'язує CD38. Згідно з одним варіантом здійснення антитіла до CD38 для застосування у рамках даного розкриття здатні знищувати CD38<sup>+</sup> клітину шляхом індукування апоптозу, антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) та комплемент-залежної цитотоксичності (CDC).

Як застосовується в даному документі, "апоптозом" називають процес запрограмованої загибелі клітини.

"Антитіло-залежною клітинно-опосередкованою цитотоксичністю" або "ADCC" називають механізм клітинно-опосередкованого імунного захисту, за допомогою якого ефektorна клітина імунної системи активно лізує клітину-мішень, в якій антигени на поверхні мембрани були зв'язані специфічними антитілами.

"Комплемент-залежною цитотоксичністю" або "CDC" у контексті даного розкриття називають лізис клітини-мішені у присутності білків системи комплементу.

Як застосовується в даному документі, "кон'югат", "імунокон'югат", "кон'югат антитіло-лікарський засіб" або "ADC" мають однакове значення та є взаємозамінними.

"Антитіло" може являти собою природне або звичайне антитіло, в якому два важких ланцюги зв'язані один з одним за допомогою дисульфідних зв'язків та кожний важкий ланцюг з'єднаний з легким ланцюгом за допомогою дисульфідного зв'язку. Існують два типи легких ланцюгів, лямбда ( $\lambda$ ) та каппа ( $\kappa$ ). Існують п'ять основних класів важких ланцюгів (або ізотипів), які визначають функціональну активність молекули антитіла: IgM, IgD, IgG, IgA та IgE. Кожний ланцюг містить відмінні домени послідовності. Легкий ланцюг включає два домени або ділянки, варіабельний домен (VL) та константний домен (CL). Важкий ланцюг включає чотири домени, варіабельний домен (VH) та три константні домени (CH1, CH2 та CH3, які разом називають CH). Варіабельні ділянки обох легких (VL) та важких (VH) ланцюгів визначають розпізнавання при зв'язуванні та специфічність щодо антигену. Домени константної ділянки легкого (CL) та важкого (CH) ланцюгів надають їм важливі біологічні властивості, такі як асоціація ланцюгів антитіла, секреція, переміщення через плаценту, зв'язування комплементу та зв'язування з Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент являє собою N-термінальну частину Fab-фрагменту імуноглобуліну та складається з варіабельних частин одного легкого ланцюга та одного важкого ланцюга. Специфічність антитіла полягає у структурній комплементарності між паратопом антитіла та антигенною детермінантою. Паратоми антитіла складаються з залишків, які переважно походять з гіперваріабельних ділянок або ділянок, що визначають комплементарність (CDR). Іноді залишки з негіперваріабельних або каркасних ділянок (FR) впливають на загальну структуру домену та, отже, на паратоп.

"Ділянками, що визначають комплементарність" або "CDR" називають амінокислотні послідовності, які разом визначають афінність та специфічність зв'язування природної Fv-ділянки сайту зв'язування нативного імуноглобуліну. Кожний легкий та важкий ланцюги імуноглобуліну мають три CDR, які позначаються CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L та CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, відповідно. Антиген-зв'язувальний сайт звичайного антитіла, отже, охоплює шість CDR, що включають набір CDR з кожної V-ділянки важкого та легкого ланцюгів.

"Каркасними ділянками" (FR) називають амінокислотні послідовності розташовані між CDR, тобто ті частини варіабельних ділянок легкого та важкого ланцюга імуноглобуліну, які є відносно консервативними серед різних імуноглобулінів одного виду. Кожний легкий та важкий ланцюг імуноглобуліну має чотири FR, які позначаються FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, та FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, відповідно.

Як застосовується в даному документі, "каркасна ділянка людини" являє собою каркасну ділянку, яка є практично ідентичною (на приблизно 85 % або більше, конкретно на 90 %, 95 %, 97 %, 99 % або 100 %) з каркасною ділянкою природного антитіла людини.

Визначення CDR/FR, що стосуються легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну, надаються на основі номенклатури Кебота (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).



Як застосовується в даному документі, термін "антитіло" позначає звичайні антитіла та їхні фрагменти, а також однодоменні антитіла та їхні фрагменти, конкретно, варіабельний домен важкого ланцюга однодоменних антитіл, та химерні, гуманізовані, біспецифічні або мультиспецифічні антитіла.

Як застосовується в даному документі, антитіло або імуноглобулін також включає "однодоменні антитіла", які були описані останнім часом та які являють собою антитіла, в яких ділянки, що визначають комплементарність, є частиною однодоменного поліпептиду. Приклади однодоменних антитіл включають антитіла з важким ланцюгом, антитіла, що природно не мають легких ланцюгів, однодоменні антитіла, що походять від звичайних чотириланцюгових антитіл, сконструйовані однодоменні антитіла. Однодоменні антитіла можуть походити від будь-якого виду, в тому числі без обмежень миші, людини, верблюда, лами, кози, кролика та великої рогатої худоби. Однодоменні антитіла можуть являти собою природні однодоменні антитіла, відомі як антитіло з важким ланцюгом, що не мають легких ланцюгів. Конкретно, у видів Camelidae, наприклад, верблюда, дромедара, лами, альпаки та гуанако, продукуються антитіла з важким ланцюгом, що природно не мають легкого ланцюга. У антитіл з важким ланцюгом від верблюдових також відсутній CH1-домен.

Варіабельні домени важкого ланцюга цих однодоменних антитіл, що не мають легких ланцюгів, відомі у даній галузі як "VHH" або "нанотіла". Подібно до звичайних VH-домених VHH містять чотири FR та три CDR. Нанотіла мають переваги над звичайними антитілами: вони приблизно в десять разів менші за молекули IgG та, внаслідок цього, правильно згорнуті функціональні нанотіла можна одержувати за допомогою *in vitro* експресії, при цьому з досягненням високого виходу. Більш того, нанотіла є дуже стабільними та стійкими до дії протеаз. Властивості та одержання нанотіл були розглянуті Harmsen та De Haard (Harmsen and De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22).

Терміном "моноклональне антитіло" або "mAb", як застосовується в даному документі, називають молекулу антитіла з єдиними амінокислотним складом, яка спрямована проти специфічного антигену, та він не має на увазі вимоги одержання антитіла за допомогою будь-якого конкретного способу. Моноклональне антитіло може продукуватися одним клоном В-клітин або гібридомою, але також може являти собою рекомбінантне, тобто одержане за допомогою генної інженерії білків.

Терміном "химерне антитіло" називають сконструйоване антитіло, у якому константна ділянка або її частина змінені, заміщені або замінені, так що варіабельна ділянка зв'язана з константною ділянкою іншого виду, або такої, що належить до іншого класу або підкласу антитіл. Химерним антитілом також називають антитіло, у якому варіабельна ділянка або її частина змінені, заміщені або замінені, так що константна ділянка зв'язана з варіабельною ділянкою іншого виду, або такої, що належить до іншого класу або підкласу антитіл. Конкретно, химерне антитіло містить VH-домен та VL-домен антитіла, що походять від тварини, що не є людиною, сполучені з CH-доменом та CL-доменом іншого антитіла, зокрема, антитіла людини. Як тварину, що не є людиною, можна використовувати будь-яку тварину, таку як миша, щур, хом'як, кролик тощо. Химерне антитіло може також позначати мультиспецифічне антитіло зі специфічністю щодо щонайменше двох різних антигенів. В одному варіанті здійснення химерне антитіло має варіабельні домени, що походять від миші, та константні домени, що походять від людини.

Терміном "гуманізоване антитіло" називають антитіло, яке спочатку було повністю або частково таким, що походить не від людини, та яке модифікували з заміщенням певних амінокислот, конкретно, у каркасних ділянках важкого та легкого ланцюгів, для того щоб уникнути або мінімізувати імунну відповідь у людини. Константні домени гуманізованого антитіла переважно являють собою CH- та CL-домени людини. В одному варіанті здійснення гуманізоване антитіло має константні домени, що походять від людини.

Стосовно химерних антитіл, гуманізація, як правило, передбачає модифікацію каркасних ділянок послідовностей варіабельної ділянки.

Амінокислотні залишки, які є частиною CDR, як правило, не будуть змінюватися під час гуманізації, хоча, у певних випадках, може бути потрібною зміна окремих амінокислотних залишків у CDR, наприклад, для видалення сайту глікозилювання, сайту дезамідування, небажаного цистеїнового залишку, лізінового залишку у випадку ADC. N-зв'язане глікозилювання відбувається шляхом приєднання олігосахаридного ланцюга до аспарагінового залишку у трипептидній послідовності Asn-X-Ser або Asn-X-Thr, де X може являти собою будь-яку амінокислоту за винятком Pro. Видалення сайту N-глікозилювання можна досягати шляхом здійснення мутації залишку або Asn, або Ser і/або Thr на інший залишок, конкретно, за допомогою консервативної амінокислотної заміни. Дезамідування аспарагінового та

глутамінового залишків може відбуватися залежно від таких факторів, як рН та розташування на поверхні. Аспарагінові залишки є особливо чутливими до дезамідування, насамперед, якщо присутні у послідовності Asn-Gly, та, меншою мірою, в інших дипептидних послідовностях, таких як Asn-Ala. Якщо такий сайт дезамідування, конкретно, Asn-Gly, присутній у послідовності CDR, 5 тому може бути потрібно видалити сайт, як правило, шляхом консервативної заміни з видаленням одного з залучених залишків. У випадку ADC, прикріплення цитотоксичного засобу до mAb може відбуватися шляхом ковалентного приєднання до бічного ланцюга лізинового залишку. Ця стерична перешкода може порушувати зв'язування mAb з антигеном. Отже, може бути потрібним видалення лізинового залишку, як правило, шляхом консервативної заміни на аргінін. Заміна у послідовності CDR для видалення одного з залучених залишків, як передбачено, також охоплюється даним розкриттям. 10

Метою гуманізації є зменшення імуногенності ксеногенного антитіла, такого як мишаче антитіло, для введення людині, при цьому із повним збереженням афінності зв'язування антигена та специфічності антитіла. Гуманізовані антитіла або антитіла інших ссавців, адаптовані для відсутності відторгнення, можна одержувати із застосуванням декількох методик, таких як змінювання поверхні та трансплантація CDR. Як застосовується в даному документі, технологія змінювання поверхні застосовує комбінацію молекулярного моделювання, статистичного аналізу та мутагенезу для зміни поверхні варіабельних ділянок антитіла, що не належать до CDR, щоб вони були схожими на поверхні відомих антитіл хазяїна-мішені. 15

Стратегії та способи змінювання поверхні антитіл та інші способи для зменшення імуногенності антитіл в організмі іншого хазяїна розкриті в патенті США № 5639641. Коротко, згідно з переважним способом, (1) створюють позиційні вирівнювання пулу з варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів антитіл з одержанням набору розташованих на поверхні положень з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюгів, де положення вирівнювання для усіх варіабельних ділянок є щонайменше приблизно на 98 % ідентичним; (2) визначають набір розташованих на поверхні амінокислотних залишків з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюгів для антитіла гризуна (або його фрагмента); (3) встановлюють набір розташованих на поверхні амінокислотних залишків з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюгів, що є найбільш ідентичним набору розташованих на поверхні амінокислотних залишків гризуна; (4) набір розташованих на поверхні амінокислотних залишків з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюгів, визначений на стадії (2), заміщують на набір розташованих на поверхні амінокислотних залишків з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюгів, встановлений на стадії (3), за винятком тих амінокислот, що розташовані в межах 5 Å від будь-якого атому з будь-якого залишку ділянки, що визначає комплементарність, антитіла гризуна; та (5) одержують гуманізоване антитіло гризуна зі специфічністю зв'язування. Таким чином, в одному варіанті здійснення гуманізовані антитіла також можна називати антитілами, що "піддані змінюванню поверхні". 20 25 30 35

Крім того, антитіла можна гуманізувати із застосуванням багатьох інших методик, у тому числі трансплантації CDR (EP0239400; WO91/09967; патенти США №№ 5530101 та 5,585,089), поліпшення або змінювання поверхні (EP0592106; EP0519596; Padlan (1991) *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:969-973) та перетасування ланцюгів (патент США № 5565332). Антитіла людини можна одержувати за допомогою багатьох способів, відомих з рівня техніки, в тому числі за допомогою способів фагового дисплею. Див. також патенти США №№ 4444887, 4716111, 5545806 та 5814318; та міжнародні патентні заявки WO98/46645, WO98/50433, WO98/24893, WO98/16654, WO96/34096, WO96/33735 та WO91/10741. 40 45

"Консервативна амінокислотна заміна" являє собою заміну, при якій амінокислотний залишок замінюється на інший амінокислотний залишок, що має R-групу бічного ланцюга з аналогічними хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю). Загалом, консервативна амінокислотна заміна не буде значною мірою змінювати функціональні властивості білка. Приклади груп амінокислот, які мають бічні ланцюги з аналогічними хімічними властивостями включають 1) аліфатичні бічні ланцюги: гліцин, аланін, валін, лейцин та ізолейцин; 2) аліфатично-гідроксильні бічні ланцюги: серин та треонін; 3) амідовмісні бічні ланцюги: аспарагін та глутамін; 4) ароматичні бічні ланцюги: фенілаланін, тирозин, та триптофан; 5) основні бічні ланцюги: лізин, аргінін та гістидин; 6) кислотні бічні ланцюги: аспарагінову кислоту та глутамінову кислоту та 7) сірковмісні бічні ланцюги: цистеїн та метіонін. Групи консервативних заміни амінокислот є наступними: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин-триптофан, лізин-аргінін, аланін-валін, глутамат-аспаратат та аспарагін-глутамін. 50 55 60

"Фрагменти" (звичайних) антитіл включають частину інтактного антитіла, конкретно,

антигензв'язувальну ділянку або варіабельну ділянку інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіла включають Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, діатіла, біспецифічні та мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіла. Фрагмент звичайного антитіла також може являти собою одностороннє антитіло, таке як антитіло з важким ланцюгом або VHH.

5 Термін "Fab" позначає фрагмент антитіла з молекулярною масою приблизно 50000 Да та активністю зв'язування антигену, в якому приблизно половина N-термінального боку H-ланцюга та повний L-ланцюг, зв'язані разом за допомогою дисульфідного зв'язку, з числа фрагментів, одержаних шляхом обробки IgG протеазою, папаїном, .

10 Терміном "F(ab')<sub>2</sub>" називають фрагмент антитіла з молекулярною масою приблизно 100000 Да, та активністю зв'язування антигену, який є трохи більшим за Fab, зв'язаний за допомогою дисульфідного зв'язку в шарнірній ділянці, з числа фрагментів, одержаних шляхом обробки IgG протеазою, пепсином.

15 Терміном "Fab'" називають фрагмент антитіла з молекулярною масою приблизно 50000 Да та активністю зв'язування антигену, який одержують за допомогою розрізання дисульфідного зв'язку в шарнірній ділянці F(ab')<sub>2</sub>-фрагменту.

20 Одноланцюговий Fv ("scFv") поліпептид являє собою ковалентно з'єднаний гетеродимер VH:VL, який звичайно експресується з химерного гена, який містить гени, що кодують VH та VL, з'єднані за допомогою лінкера, що кодує пептид. scFv-фрагмент за даним розкриттям включає CDR, які підтримуються у відповідній конформації, зокрема, із застосуванням методики генної рекомбінації. Бівалентні та мультивалентні фрагменти антитіла можуть утворюватися або мимовільно шляхом об'єднання моновалентних scFv, або їх можна одержувати шляхом об'єднання моновалентних scFv за допомогою пептидного лінкера, як, наприклад, бівалентні sc(Fv)<sub>2</sub>.

"dsFv" являє собою гетеродимер VH:VL, стабілізований дисульфідним зв'язком.

25 "(dsFv)<sub>2</sub>" позначає два dsFv, об'єднані за допомогою пептидного лінкера.

30 Термін "біспецифічне антитіло" або "BsAb" позначає антитіло, яке об'єднує антиген-зв'язувальні сайти двох антитіл у межах однієї молекули. Таким чином, BsAb здатні зв'язувати два різні антигени одночасно. Усе частіше генну інженерію застосовують для розробки, модифікації та одержання антитіла або похідних антитіла з необхідним набором властивостей зв'язування та ефекторних функцій, як описано, наприклад, у EP 2050764 A1.

Термін "мультиспецифічне антитіло" позначає антитіло, яке об'єднує антиген-зв'язувальні сайти двох або більше антитіл у межах однієї молекули.

35 Терміном "діатіла" називають невеликі фрагменти антитіла з двома антиген-зв'язувальними сайтами, при цьому фрагменти включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в один поліпептидний ланцюг (VH-VL). Шляхом застосування лінкера, який є надто коротким, щоб дозволити утворення парних зв'язків між двома доменами на одному ланцюгу, домени примушують утворювати парні зв'язки з комплементарними доменами іншого ланцюга та створювати два антиген-зв'язувальні сайти.

40 Антитіло для застосування у рамках даного розкриття може являти собою одне з моноклональних антитіл до CD38, що названі 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 та 38SB39, які описані в WO2008/047242, або їхні похідні, одержані шляхом технології змінювання поверхні.

45 Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 4, 5 та 6. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 44, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID NO: 38.

50 Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 7, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 8 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 9, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 10, 11 та 12. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 45, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID NO: 39.

55 Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 13, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 14 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 15, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 16, 17 та 18. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 46, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID

NO: 40.

Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 19, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 20 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 21, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 22, 23 та 24. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 47, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID NO: 41.

Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 25, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 26 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 27, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 28, 29 та 30. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 48, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID NO: 42.

Конкретно, антитіло до CD38 у контексті даного розкриття містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 31, CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 32 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 33, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить три послідовні CDR з амінокислотними послідовностями, що складаються з SEQ ID NO: 34, 35 та 36. Конкретно, зазначене антитіло має варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 49, та варіабельний домен легкого ланцюга, що містить ланцюг з SEQ ID NO: 43.

Крім того, у контексті даного розкриття охоплені антитіла, що містять послідовність, яка щонайменше на 85 %, більш конкретно, щонайменше на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовностям, розкритим у даному документі.

Послідовність "щонайменше на 85 % ідентична еталонній послідовності" являє собою послідовність, що характеризується, за її повною довжиною, 85 % або більше, конкретно, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю послідовності з повною довжиною еталонної послідовності.

Відсоток "ідентичності послідовності" можна визначати шляхом порівняння двох послідовностей, з оптимальним вирівнюванням по всьому вікню порівняння, де частина полінуклеотидної або поліпептидної послідовності у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто гепи) порівняно з еталонною послідовністю (яка не містить додавання або делеції) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Відсоток розраховують шляхом визначення числа положень, у яких ідентична нуклеїнова основа або амінокислотний залишок розташовані в обох послідовностях з одержанням числа положень, що збігаються, ділення числа положень, що збігаються, на загальне число положень у вікні порівняння та множення результату на 100 з одержанням відсоткової частки ідентичності послідовності. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння здійснюють за допомогою глобального попарного вирівнювання, наприклад, із застосуванням алгоритму Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). Відсоток ідентичності послідовності можна легко визначити, наприклад, із застосуванням програми Needle з матрицею BLOSUM62 та наступними параметрами штраф за відкриття гепу=10, штраф за подовження гепу=0,5.

В одному варіанті здійснення антитіла до CD38 являють собою гуманізовані антитіла до CD38, одержані шляхом технології змінювання поверхні. Такі антитіла також можна називати антитілами, що "піддані змінюванню поверхні".

В одному варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 1, 2 та 3, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 4, 5 та 6.

В іншому варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 7, 8 та 9, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 10, 11 та 12.

В іншому варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де

зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 13, 37 та 15, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 16, 17 та 18.

5 В іншому варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 19, 20 та 21, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 22, 23 та 24.

10 В іншому варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 25, 26 та 27, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 28, 29 та 30.

20 В ще одному варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла, містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 31, 32 та 33, та де зазначений легкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність, з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 34, 35 та 36.

25 В одному варіанті здійснення в даному розкритті представлені піддані змінюванню поверхні і/або гуманізовані антитіла, що містять  $V_H$  з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи з SEQ ID NO: 50 та 51. У ще одному варіанті здійснення піддана змінюванню поверхні і/або гуманізована версія антитіла містить  $V_H$  з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 50. В іншому варіанті здійснення гуманізована версія антитіла містить  $V_H$  з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 51.

30 В іншому варіанті здійснення в даному розкритті представлені гуманізовані антитіла, що містять  $V_L$  з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи з SEQ ID NO: 52, 53, 54 та 55. В іншому варіанті здійснення гуманізована версія антитіла містить  $V_L$  з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи з SEQ ID NO: 52 та 53. В іншому варіанті здійснення гуманізована версія антитіла містить  $V_L$  з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи з SEQ ID NO: 54 та 55.

35 У специфічному варіанті здійснення антитіло згідно з даним розкриттям являє собою гуманізоване і/або піддане змінюванню поверхні антитіло під назвою hu38SB19, яке містить  $V_H$  з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 50, та містить  $V_L$  з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 52.

40 В іншому варіанті здійснення антитіло згідно з даним розкриттям являє собою даратумумаб. У специфічному варіанті здійснення антитіло для застосування згідно з даним розкриттям являє собою "голе" антитіло, тобто не зв'язане з будь-яким лікарським засобом з утворенням кон'югата антитіло-лікарський засіб.

45 Антитіла для застосування згідно з даним розкриттям специфічно зв'язують CD38 та здатні знищувати CD38<sup>+</sup> клітину шляхом індукування апоптозу, антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC). У специфічному варіанті здійснення антитіла для застосування згідно з даним розкриттям здатні знищувати CD38<sup>+</sup> клітину *in vitro* шляхом індукування апоптозу, навіть коли клітини, які обробляли антитілом, не були пов'язані з вторинним антитілом до IgG людини.

50 Крім того, у контексті даного розкриття охоплені гуманізовані антитіла, що містять послідовність, яка щонайменше на 85 %, більш конкретно, щонайменше на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовностям, розкритим вище.

55 Антитіла згідно з даним розкриттям можна одержувати за допомогою стандартних методик імунізації тварин, одержання гібридом та добору антитіл із специфічними характеристиками. Конкретно, 38SB19, антитіло до CD38, одержують як описано у прикладі 4 міжнародної патентної заявки WO2008/047242, тобто згідно з наступним протоколом клонування та секвенування легкого та важкого ланцюгів антитіл до CD38:

60 (i) одержання РНК з гібридомних клітин, які продукують антитіло 38SB19, наступним чином: препарати загальної РНК одержували з  $5 \times 10^6$  гібридомних клітин, які продукують антитіло 38SB19, із застосуванням RNeasy miniprep kit від Qiagen. Коротко,  $5 \times 10^6$  клітин осаджували та

ресуспендували у 350 мкл буфера RLT (містить 1 %  $\beta$ -меркаптоетанолу). Суспензію гомогенізували шляхом проходження її крізь шприц з голкою 21,5 калібру приблизно 10–20 разів або доти, доки він більше не був в'язким. Етанол (350 мкл 70 % водного етанолу) додавали до гомогенату, якій добре перемішували. Розчин переносили до спін-колонки, вміщали у 2-мл пробірку для збирання фільтрату та центрифугували при  $>8000 \times g$  протягом 15 секунд. Колонку промивали два рази за допомогою 500 мкл буферу RPE, потім переносили до нової пробірки та елюювали за допомогою 30 мкл води, що не містить РНКаз, та центрифугували протягом 1 хвилини. Елюат (30 мкл) повертали до колонки для другого елюювального центрифугування протягом 1 хвилини. Аліквоту з 30 мкл елюату розводили водою та застосовували для вимірювання УФ-поглинання при 260 нм для кількісної оцінки РНК.

(ii) одержання кДНК за допомогою реакції зі зворотною транскриптазою (RT) наступним чином: кДНК варіабельної ділянки антитіла 38SB19 одержували з загальної РНК із застосуванням набору Superscript II від Invitrogen. Точно дотримувалися протоколів у наборі, використовуючи до 5 мкг загальної РНК з мініпрепів Qiagen. Коротко, РНК, 1 мкл випадкових праймерів та 1 мкл суміші дНТФ доводили до 12 мкл за допомогою стерильної дистильованої води, що не містить РНКаз, та інкубували при 65°C протягом 5 хвилин. Потім суміш вміщали на лід на щонайменше 1 хвилину. Після цього додавали 4 мкл 5 х реакційного буфера, 2 мкл 0,1 M DTT та 1 мкл RNaseOUT та суміш інкубували при 25°C протягом 2 хвилин у термоциклері MJ Research. Термоциклер зупиняли, щоб можна було додати 1 мкл ферменту SuperscriptII, та потім запускали повторно протягом додаткових 10 хвилин при 25°C перед переключенням на 55°C протягом 50 хвилин. Реакцію піддавали інактивації нагріванням шляхом нагрівання до 70°C протягом 15 хвилин та РНК видаляли шляхом додавання 1 мкл РНКазі H та інкубацією при 37°C протягом 20 хвилин.

(iii) ПЛР-реакції з виродженими праймерами: процедура ПЛР-реакції з виродженими праймерами першого раунду за участі кДНК, одержаної з гібридомних клітин, базувалася на способах, описаних у Wang et al. (2000) та Co et al. (1992). Праймери для цього раунду (таблиця 1) містять сайти рестрикції для сприяння клонуванню в плазміді pBluescriptII.

Таблиця 1:

Праймери, застосовані для ПЛР-реакції з виродженими праймерами

Праймер	Послідовність
BamIlgG1 (SEQ ID NO. 56)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Aba m (SEQ ID NO. 57)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO. 58)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO. 59)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
SacIMK (SEQ ID NO. 60)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO. 61)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG TGC

Праймери, застосовані для ПЛР-реакцій з виродженими праймерами, базуються на таких з Wang et al., 2000, за винятком HindKL, що базується на Co et al. 1992. Змішані основи визначаються наступним чином: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V=A+C+G.

Компоненти ПЛР-реакції (таблиця 2) змішували на льоді в тонкостінних пробірках для ПЛР та потім переносили в ампліфікатор MJ research, попередньо нагрітий та поставлений на паузу

при 94°C. Реакції проводили із застосуванням програми, що одержана з Wang et al., 2000, наступним чином:

Назва: Wang45

94°C 3:00 хв.

5 94°C 0:15 с

45°C 1:00 хв.

72°C 2:00 хв.

Перехід на стадію 2 29 разів

72°C 6:00 хв.

10 4°C до кінця

Кінець.

Потім суміші з ПЛР-реакцій проганяли на гелі з 1 % легкотопкої агарози, смужки розміром 300-400 п.о. вирізали, очищали із застосуванням мініколонок для очищення ДНК Zymo, та посиляли в Agencourt biosciences для секвенування. Відповідні 5" та 3" ПЛР-праймери застосовували як праймери для секвенування з одержанням кДНК варіабельних ділянок 38SB19 в обох напрямках.

(iv) Клонування послідовностей 5'-кінця виконували наступним чином: Оскільки дегенеративні праймери, які застосовували для клонування кДНК-послідовностей варіабельної ділянки 38SB19 легкого ланцюга та важкого ланцюга, змінюють послідовності 5'-кінця, були необхідними додаткові роботи з секвенування для розшифровки повних послідовностей. Попередню кДНК-послідовність зі способів, описаних вище, застосовували для пошуку на сайті NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) щодо мишачих послідовностей зародкового типу, від яких походить послідовність 38SB19. ПЛР-праймери розробляли (таблиця 3) для відпалювання з лідерною послідовністю мишачого антитіла, отже, нова ПЛР-реакція могла давати кДНК повної варіабельної ділянки, не зміненої через ПЛР-праймери. ПЛР-реакції, очищення смужок та секвенування здійснювали як описано вище.

Таблиця 2:

Суміші для ПЛР-реакцій з легким та важким ланцюгом для клонування кДНК-послідовностей варіабельних ділянок 38SB19.

Суміш для реакції з легким ланцюгом	Суміш для реакції з важким ланцюгом
5 мкл 10 X буфера для ПЛР-реакції (Roche) 4 мкл 10 мМ суміші дНТФ (по 2,5 мМ кожного) 2 мкл шаблону (RT-реакція) 5 мкл 10 мкМ лівого праймера Sac1MK 5 мкл 10 мкМ правого праймера HindKL 5 мкл DMSO 0,5 мкл Taq-полімерази (Roche) 23,5 мкл стерильної дистильованої H <sub>2</sub> O Загалом 50 мкл	5 мкл 10 X буфера для ПЛР-реакції (Roche) 4 мкл 10 мМ суміші дНТФ (по 2,5 мМ кожного) 2 мкл шаблону (RT-реакція) 2,5 мкл 10 мкМ лівого праймера EcoMH1 2,5 мкл 10 мкМ лівого праймера EcoMH2 5 мкл 10 мкМ правого праймера BamIG1 5 мкл DMSO 0,5 мкл Taq-полімерази (Roche) 23,5 мкл стерильної дистильованої H <sub>2</sub> O Загалом 50 мкл

(v) Пептидний аналіз для підтвердження послідовності виконували наступним чином: Інформацію щодо кДНК-послідовності варіабельної ділянки об'єднували з послідовністю константної ділянки зародкового типу з одержанням кДНК-послідовності антитіла повної довжини. Потім обчислювали молекулярну масу важкого ланцюга і легкого ланцюга та порівнювали з молекулярною масою, одержаною за допомогою аналізів LC/MS мишачого антитіла 38SB19. У таблиці 5 з патенту США № 8153765 наведена обчислена маса кДНК-послідовностей для LC та HC 38SB19 разом зі значеннями, виміряними за допомогою LC/MS. Вимірювання молекулярної маси відповідали кДНК-послідовностям як легкого, так і важкого ланцюга 38SB19.

Таблиця 3:

Праймери для мишачих лідерних послідовностей 5'-кінця, застосовані для ПЛР-реакцій другого раунду з 38SB19.

Праймер	Послідовність
Легкий ланцюг Лідерна послідовність LC 38SB19 (SEQ ID NO. 62) Важкий ланцюг Лідерна послідовність 1 HC 38-19 (SEQ ID NO. 63)	ATGGAGTCACAGATTCAGGTC TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC

У таблиці 3 представлені праймери для мишачих лідерних послідовностей 5'-кінця, застосовані для ПЛР-реакцій другого раунду з 38SB19. Праймери для 3'-кінця є ідентичними тим, що застосовували під час реакцій першого раунду, оскільки вони є праймерами для відповідних послідовностей константних ділянок.

Більш конкретно, гуманізовані антитіла 38SB19 можна одержувати, як описано у прикладі 5 міжнародної патентної заявки WO2008/047242, тобто згідно з наступним протоколом: Послідовності варіабельних ділянок для hu38SB19 піддавали оптимізації кодонів та синтезували за участі Blue Heron Biotechnology. Послідовності фланкували сайтами рестриктаз для клонування в рамку зчитування з відповідними послідовностями константних ділянок в плазміді для експресії у клітинах ссавців як одного ланцюга, так і тандемних подвійних ланцюгів. Варіабельну ділянку легкого ланцюга клонували в сайти EcoRI та BsiWI в обох плазмідах ps38SB19LCZv1.0 та ps38SB19v1.00 (фіг. 2A та 2C у WO2008/047242). Варіабельну ділянку важкого ланцюга клонували в сайти HindIII та ApaI в обох плазмідах ps38SB19HCNv1.0 та ps38SB19v1.00 (фіг. 2B та 2C у WO2008/047242). Ці плазміди можна застосовувати для експресії hu38SB19 під час або тимчасових, або стабільних трансфекцій клітин ссавців. Аналогічні конструкції векторів експресії застосовували для одержання інших химерних та гуманізованих антитіл. Тимчасові трансфекції для експресії hu38SB19 у клітинах HEK-293T здійснювали із застосуванням реагентів CaPO<sub>4</sub> від BD biosciences. Надані протоколи дещо модифікували для поліпшення виходів експресії. Коротко, 2 × 10<sup>6</sup> клітин HEK-293T висівали на чашки Петрі для культур тканин діаметром 10 см, вкриті поліетиленіміном (PEI) за 24 год. перед трансфекцією. Трансфекцію розпочинали промиванням клітин за допомогою PBS та заміщенням середовища на 10 мл DMEM (Invitrogen) з 1 % FBS з дуже низьким вмістом IgG (Hyclone). Розчин А (10 мкг ДНК, 86,8 мкг розчину Ca<sup>2+</sup> та доведений до 500 мкл за допомогою H<sub>2</sub>O) додавали по краплинах до розчину В під час перемішування на вортексі. Суміш інкубували при RT протягом 1 хв. та 1 мл суміші додавали по краплинах у кожен чашку Петрі діаметром 10 см. Приблизно через 16 год. після трансфекції середовище заміщували на 10 мл свіжого DMEM з 1 % FBS з дуже низьким вмістом IgG. Через приблизно 24 години в кожен чашку Петрі діаметром 10 см додавали 2 мМ бутират натрію. Трансфекцію аналізували через 4 дні. Надосадову рідину готували для афінної хроматографії з білком А шляхом додавання 1/10 об'єму 1 М буферу Tris/HCl, pH 8,0. Надосадову рідину з відрегульованим pH фільтрували крізь 0,22 мкм мембранний фільтр та завантажували на сефарозну колонку з білком А (HiTrap Protein A HP, 1 мл, Amersham Biosciences), врівноважену за допомогою буфера для зв'язування (PBS, pH 7,3). Попередню колонку з Q-сефарозою (10 мл) розташовували вище за колонку з білком А під час завантаження зразка для зменшення забруднення клітинним матеріалом, таким як ДНК. Після завантаження зразка попередню колонку видаляли та орієнтацію колонки з білком А змінювали на протилежну для промивання та елювання. Колонку промивали за допомогою буфера для зв'язування, поки не одержували стабільний вихідний рівень з відсутністю поглинання при 280 нм. Антитіло елювали за допомогою буфера на основі 0,1 М оцтової кислоти, що містив 0,15 М NaCl, pH 2,8, із застосуванням швидкості потоку, що становила 0,5



мл/хв. Збирали фракції, що становили приблизно 0,25 мл, та нейтралізували додаванням 1/10 об'єму 1М Tris/HCl, рН 8,0. Пікову фракцію(ї) діалізували протягом ночі двічі проти PBS та очищене антитіло оцінювали кількісно за поглинанням при OD<sub>280</sub>. Гуманізовані та химерні антитіла можна також очищувати із застосуванням колонки з білком G за дещо відмінних процедур.

Усі ілюстративні химерні, гуманізовані і/або піддані змінюванню поверхні антитіла до CD38 експресували та очищували із застосуванням процедур, аналогічних описаним вище.

Автори даного винаходу визначали для антитіл за даним розкриттям придатні дозу для введення та схему, щоб одержати спосіб лікування раку з доброю переносимістю, що дозволяє лікувати суб'єктів, що страждають на CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення, конкретно, на CD38<sup>+</sup> множинну мієлому, більш конкретно, на рецидивну і/або резистентну CD38<sup>+</sup> множинну мієлому.

Отже, режим з прискореним підвищенням дози застосовували для перших п'яти рівнів дози в діапазоні від 0,0001 мг/кг до 0,1 мг/кг, які вводили кожні два тижні, з одним суб'єктом, що підлягає оцінці, на рівень дози. Усі подальші рівні дози, такі як 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг та 20 мг/кг, вводили кожні 2 тижні, 10 мг/кг також вводили щотижня, з наступною класичною схемою 3+3 для підвищення дози на основі рівня дози токсичності, медіанна кількість циклів перебувала в діапазоні від 2,0 до 50,0 для введення.

У межах цього дослідження автори даного винаходу продемонстрували, що застосоване антитіло має профіль безпеки, який легко контролювати, з максимальною стерпною дозою, яка становить вище ніж 10 мг/кг.

Дослідження імунотоксичності, здійснені авторами даного дослідження, показали, що в суб'єкті-людині не продукуються антитіла проти антитіла до CD38.

Крім того, автори даного винаходу змогли показати, що антитіло за даним розкриттям характеризується високою ефективністю зв'язування в людині, що продемонстроване високою зайнятістю рецепторів за низьких доз. Зайнятість рецепторів виявляли, наприклад, за рівня дози 1 мг/кг, та вона сягала діапазону 84,1-97,7 % при введенні 10 мг/кг кожні два тижні.

Зайнятість рецепторів, як правило, оцінювали із застосуванням двох моноклональних антитіл (mAb), що зв'язуються з двома різними епітопами антигену CD38. MAb1 є специфічним щодо того самого епітопу, що й, наприклад, hu38SB19, та, таким чином, є показником вільних сайтів CD38 (не окупованих за допомогою, наприклад, hu38SB19). Друге моноклональне антитіло, mAb2, спрямоване на інший епітоп, ніж hu38SB19, забезпечує позитивний контроль щодо присутності CD38<sup>+</sup> клітин та оцінку кількості антигену CD38, що залишається на поверхні клітини після *in vitro* введення лікарського засобу. Застосування гранул як калібраторів та непряме виявлення забезпечує можливість кількісного підходу без будь-якої модифікації здатності до зв'язування в hu38SB19. Комбінація цих результатів надавати значення щільності і зайнятості рецепторів на клітину.

Не спостерігали значного підвищення C<sub>max</sub> у циклі 2 порівняно з C<sub>max</sub> у циклі 1 для діапазону доз від 0,03 до 3 мг/кг.

Крім того, автори даного винаходу демонструють, що антитіло досягає інгібування росту пухлини з пороговим рівнем при C<sub>max</sub> для 1 пацієнта за рівня дози 5 мг/кг, та для 5 пацієнтів за рівня дози 10 мг/кг.

Автори даного винаходу продемонстрували, зокрема, що в суб'єкта, який страждає на CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення, конкретно, на CD38<sup>+</sup> множинну мієлому, більш конкретно, на рецидивну і/або резистентну CD38<sup>+</sup> множинну мієлому, спостерігали певну відповідь, якщо антитіло до CD38 за даним розкриттям вводили з дозами 1 мг/кг, 5 мг/кг та 10 мг/кг.

Автори даного винаходу спостерігали, зокрема, що пороговий рівень інгібування росту пухлини досягався при C<sub>max</sub> для 1 пацієнта за рівня дози 5 мг/кг, та для 5 пацієнтів за рівня дози 10 мг/кг.

Згідно з даним розкриттям антитіло призначене для застосування як лікарського препарату, де зазначене антитіло вводиться суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі 20 мг/кг або менше.

В одному варіанті здійснення антитіло призначене для застосування в лікуванні CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, конкретно, для лікування множинної мієломи, найбільш конкретно, для лікування рецидивної і/або резистентної множинної мієломи.

CD38<sup>+</sup> гематологічні злоякісні новоутворення, що підлягають лікуванню у контексті даного розкриття, визначені у розділі "CD38<sup>+</sup> гематологічні злоякісні новоутворення".

Суб'єкт-людина визначений вище у розділі "суб'єкт".

У контексті даного розкриття термін "лікувати" або "лікування", як застосовується в даному

документі, означає зворотній розвиток, полегшення, інгібування прогресування або запобігання порушенню або стану, до яких такий термін застосовують, або одному або декільком симптомам такого порушення або стану.

5 Під терміном "лікування CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення", як застосовується в даному документі, мається на увазі інгібування росту CD38<sup>+</sup> злоякісних клітин пухлини і/або розвиток метастазів від зазначеної CD38<sup>+</sup> пухлини. Таке лікування також може приводити до зворотного росту пухлини, тобто, зменшення розміру вимірюваної пухлини. Зокрема, таке лікування веде до повного зворотного розвитку CD38<sup>+</sup> пухлини або CD38<sup>+</sup> метастазів.

10 Під "терапевтично ефективною кількістю" антитіла, в контексті даного розкриття, мають на увазі кількість антитіла, достатню для лікування зазначеного CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, як встановлено авторами даного винаходу та розкрито в даному документі.

У конкретному варіанті здійснення зазначена терапевтично ефективна кількість антитіла, яке вводять суб'єкту, являє собою дозу в діапазоні від 0,0001 мг/кг до 20 мг/кг, конкретно, дозу в 15 діапазоні від 1 мг/кг до 20 мг/кг, більш конкретно, 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг або 20 мг/кг.

В одному варіанті здійснення антитіло за даним розкриттям можна вводити один раз на тиждень або один раз кожні два тижні.

20 В іншому варіанті здійснення зазначена терапевтично ефективна кількість антитіла, яке вводять суб'єкту, являє собою дозу в діапазоні від 1 мг/кг до 20 мг/кг, від 3 мг/кг до 20 мг/кг, від 5 мг/кг до 20 мг/кг або від 10 мг/кг до 20 мг/кг, наприклад, один раз на тиждень або один раз на два тижні. Дійсно, було показано, що ці дози є безпечними, при цьому для деяких індивідів була показана ефективність.

25 У ще одному варіанті здійснення зазначена терапевтично ефективна кількість антитіла, яке вводять суб'єкту, являє собою дозу 10 мг/кг один раз на тиждень або 20 мг/кг, наприклад, один раз на тиждень або один раз на два тижні.

У деяких варіантах здійснення антитіло за даним розкриттям можна вводити згідно з періодичною програмою з інтервалом між кожним введенням в 1 тиждень або 2 тижня, який 30 може бути подовженим на 1-2 тижні залежно від стерпності попереднього введення. Проте автори даного винаходу спостерігали переважно побічні ефекти, які не були серйозними.

Згідно з цим, у конкретному варіанті здійснення введення антитіла повторюють як новий цикл безпосередньо після попереднього циклу.

35 Як застосовується в даному документі, "циклом" називають, у випадку введення "один раз на тиждень" один тиждень, у випадку введення "один раз на два тижні" один цикл відповідає двом тижням.

В одному варіанті здійснення кількість циклів введення може складати від 2 до 50, конкретно, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 45, 50 циклів.

40 Кількість циклів введення антитіла за даним розкриттям, таким чином, може бути вибрана 3 групи, яку складають 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 45, 50 циклів.

Антитіло за даним розкриттям вводять внутрішньовенно.

У деяких варіантах здійснення дозу можна збільшувати протягом лікування після оцінки відповіді захворювання на терапію.

45 Мінімальна доза у контексті даного розкриття відповідає 0,0001 мг/кг, де рівень дози 0,0001 мг/кг, представляє 10 % теоретичної зайнятості рецепторів CD38 на нормальних В- та Т-клітинах.

У деяких варіантах здійснення внутрішньовенне введення здійснюють за певної швидкості інфузії.

50 Конкретно, антитіло вводитимуть за початкової швидкості інфузії від 0,042 мг/год. до 250 мг/год., конкретно, початкова швидкість інфузії становить 0,042 мг/год.

У деяких варіантах здійснення початкова швидкість інфузії залежить від дози, яка має вводитися.

55 Згідно з цим, в одному прикладі, антитіло за даним розкриттям, як правило, вводять, наприклад, з дозою 0,0001 мг/кг за початкової швидкості 0,042 мг/год. протягом сукупно 3 мл, наприклад, з дозою 0,001 мг/кг за початкової швидкості 0,42 мг/год. протягом сукупно 3 мл, наприклад, з дозою 0,01 мг/кг за початкової швидкості 1, 4 мг/год., наприклад, з дозою 0,03 мг/кг за початкової швидкості 4,2 мг/год., наприклад, з дозою 0,1 мг/кг за початкової швидкості 7 мг/год., наприклад, з дозою 0,01 мг/кг за початкової швидкості 1,4 мг/год., наприклад, з дозою 0,3 мг/кг за початкової швидкості 10,5 мг/год., наприклад, з дозою 1 мг/кг за початкової швидкості 17,5 мг/год., наприклад, з дозою 3 мг/кг за початкової швидкості 52,5 мг/год., 60

наприклад, з дозою 5 мг/кг за початкової швидкості 87,5 мг/год., наприклад, з дозою 10 мг/кг за початкової швидкості 175 мг/год. та, наприклад, з дозою 20 мг/кг за початкової швидкості 250 мг/год.

Під час введення за суб'єктом, як правило, спостерігають щодо ознак реакцій гіперчутливості, та введення продовжують лише за відсутності реакцій гіперчутливості.

Проте буде зрозумілим, що, хоча точний час введення (один раз на тиждень або один раз кожні два тижні), кількість циклів та початкова швидкість інфузії будуть перебувати в межах діапазону значень, розкритих у даному документі, проте, точні значення вирішуватиме лікар для будь-якого конкретного суб'єкта залежно від факторів, в тому числі CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, що підлягає лікуванню, та тяжкості порушення; активності застосованого специфічного антитіла; застосованої специфічної композиції, віку, маси тіла, загального стану здоров'я, статі та раціону суб'єкта.

Буде зрозумілим, що лікар може модифікувати та адаптувати схему введення, базуючись на відповіді захворювання на терапію.

"Відповідь захворювання на терапію" можна визначати згідно зі стандартними критеріями для гематологічних злоякісних новоутворень та визначенням стадії.

Способи оцінки відповіді захворювання на терапію гематологічного злоякісного новоутворення, конкретно, CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, відомі фахівцю у даній галузі.

Як правило, способи оцінки відповіді захворювання на терапію можна вибрати з групи, яку складають оцінка загального стану за шкалою Карновського, кількісна оцінка специфічних маркерів, біопсія і/або пункція кісткового мозку, радіологічна візуалізація плазмацитоми, дослідження кісток скелету, кількісна оцінка М-білка (у сироватці і/або 24-годинній сечі) та рівні вільних легких ланцюгів у сироватці або рівні легких ланцюгів у сечі, β2-мікроглобулін сироватки, біопсія лімфатичних вузлів і/або радіологічна оцінка пухлини (за допомогою рентгену, сканування за допомогою комп'ютерної томографії [CT], PET-сканування або магнітно-резонансної візуалізації [MRI]), аналіз крові, в тому числі визначення бластних клітин.

Найкращі способи оцінки відповіді захворювання на терапію в гематологічного злоякісного новоутворення залежать від типу CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення та відомі фахівцю в даній галузі.

Базуючись на результатах, одержаних з оцінки відповіді захворювання на терапію, відповідь захворювання на терапію можна потім розділяти згідно зі стандартними критеріями для фонового захворювання та класифікувати на повну відповідь або повну ремісію (CR), часткову відповідь (PR), стабільне захворювання (SD) або прогресуюче захворювання (PD).

"Шкалою Карновського" називають шкалу від 100 до 0, де 100 являє собою "відмінне" здоров'я, а 0 являє собою смерть.

"Маркери", застосовні у контексті оцінки відповіді, можуть включати, як правило, маркери у сироватці і/або плазмі, без обмеження ними, такі як Hs-CRP, фактор некрозу пухлини альфа (TNF-α), IL-6, IL-1-β, IFN-λ та щільність і зайнятість рецепторів CD38.

В одному прикладі методики для оцінки відповіді захворювання на терапію в суб'єкта, що страждає на множинну мієлому, являють собою біопсію і/або пункцію кісткового мозку, радіологічну візуалізацію плазмацитоми, дослідження кісток скелету, кількісну оцінку М-білка, як пояснюється вище, та вимірювання β2-мікроглобуліну сироватки.

Крім того, оцінка відповіді захворювання на терапію може включати оцінку щільності рецепторів та зайнятості рецепторів на циркулюючих клітинах пухлини (у периферичній крові), щільності рецепторів та зайнятості рецепторів на бластних та плазматичних клітинах у кістковому мозку та рівня антитіл до лікарського препарату (ADA) в людини.

Антитіло за даним розкриттям можна вводити у формі фармацевтичної композиції, що включає фармацевтично прийнятний наповнювач та необов'язково матриці для уповільненого вивільнення, такі як біорозкладні полімери, для утворення терапевтичних композицій.

"Фармацевтичним" або "фармацевтично прийнятним" називають хімічні речовини та композиції, які не призводять до несприятливої, алергічної або іншої небажаної відповіді при введенні ссавцю, зокрема людині, за необхідності. Фармацевтично прийнятним носієм або наповнювачем називають нетоксичний твердий, напівтвердий або рідкий заповнювач, розріджувач, матеріал для інкапсуляції або допоміжну речовину для складання будь-якого типу.

Форма фармацевтичних композицій, що включають антитіло за даним розкриттям, звичайно залежить від стану, що підлягає лікуванню, тяжкості хвороби, віку, маси та статі суб'єкта тощо.

Антитіло за даним розкриттям вводять до складу для внутрішньовенного введення.

Зокрема, фармацевтичні композиції, що включають антитіло за даним розкриттям, можуть містити середовища, які є фармацевтично прийнятними для складу, який можна ін'єктувати.

Вони можуть являти собою, конкретно, ізотонічні стерильні сольові розчини (однозаміщеного або двозаміщеного фосфату натрію, хлориду натрію, калію, кальцію або магнію і т.п. або сумішей таких солей) або сухі, зокрема, піддані сублімаційному сушінню композиції, які при додаванні, залежно від випадку, стерилізованої води або фізіологічного сольового розчину

5 забезпечують утворення ін'єкційних розчинів.

Для одержання фармацевтичних композицій ефективну кількість антитіла за даним розкриттям можна розчиняти або диспергувати в фармацевтично прийнятному носії або водному середовищі.

10 Фармацевтичні форми, придатні для ін'єкційного застосування, включають стерильні водні розчини або дисперсії та стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій для негайного прийому. В усіх випадках форма має бути стерильною та має бути плинною до такого ступеня, щоб її можна було легко вводити через шприц. Вона має бути стабільною за умов виробництва та зберігання та має зберігатися від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби.

15 Носій може являти собою розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь та рідкий поліетиленгліколь тощо) та їх придатні суміші. Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру частинки у випадку дисперсії та шляхом застосування поверхнево-активних речовин, стабілізуювальних засобів або антиоксидантів. Запобігання дії мікроорганізмів може зумовлюватися протибактеріальними та протигрибковими засобами. У багатьох випадках переважним буде включення ізотонічних засобів, наприклад, цукрів або хлориду натрію.

20 Стерильні ін'єкційні розчини одержують шляхом включення активних сполук в необхідну кількість відповідного розчинника з низкою інших інгредієнтів, перелічених вище, за необхідності, з подальшою стерилізацією фільтруванням. Як правило, дисперсії одержують шляхом включення різних стерилізованих активних інгредієнтів в стерильне середовище, яке містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з наведених вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами одержання є методики вакуумного сушіння та сублімаційного сушіння, які дають порошок з активним інгредієнтом, а також з будь-яким додатковим необхідним інгредієнтом з їх попередньо стерилізованого фільтрацією розчину.

Після складання розчини будуть вводитися способом, сумісним з дозованим складом та в такій кількості, що є терапевтично ефективною. Склади легко вводити у різних стандартних лікарських формах, таких як тип ін'єкційних розчинів, описаний вище, але також можна використовувати капсули з вивільненням лікарського засобу тощо.

35 Для внутрішньовенного введення у водному розчині, наприклад, розчин потрібно належним чином забуферити, за необхідності, та різкому розріджувачу, насамперед, надають ізотонічність за допомогою достатньої кількості сольового розчину або глюкози. Ці конкретні водні розчини є особливо придатними для внутрішньовенного введення. При цьому, стерильні водні середовища, які можна використовувати, будуть відомі фахівцям у даній галузі у зв'язку з даним розкриттям. Наприклад, одну дозу можна розчиняти у 1 мл ізотонічного розчину NaCl та або додавати до 1000 мл рідини для гіподермоклізісу, або ін'єкувати внутрішньовенно в намічене місце інфузії (див., наприклад, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Деяке варіювання дози буде безумовно відбуватися залежно від стану суб'єкта, що підлягає лікуванню. Особа, відповідальна за введення, у будь-якому випадку, визначатиме дозу, що підходить для окремого суб'єкта.

В одному прикладі антитіло вводять до складу для внутрішньовенного введення, отже, антитіло представлено як концентрат розчину для інфузії в ампулах, наприклад, що містять 5 мг/мл (100 мг/20 мл) антитіла за даним розкриттям.

50 Для введення суб'єктам відповідного об'єму склад з антитілом, як правило, розводять в інфузійному мішку за допомогою, наприклад, 0,9 % розчину хлориду натрію. Кінцевий об'єм інфузії, що відповідає дозі антитіла за даним розкриттям, вводять протягом періоду часу, що залежить від дози, що підлягає введенню, та, таким чином, від кількості білка, що вводиться за годину.

55 У специфічному варіанті здійснення антитіло до CD38 для застосування згідно з даним розкриттям вводять як некон'юговане антитіло. Некон'юговане антитіло до CD38 можна вводити окремо або разом з дексаметазоном, або в комбінації з хімотерапевтичним лікарським засобом, вибраним з групи, що складається з леналідоміду, карфілзомібу, бортезомібу, мелфалану, вінкрістину, цитарабіну та циклофосфаміду, необов'язково разом з дексаметазоном. Якщо його не вводять окремо, антитіло до CD38 та інший лікарський засіб (засоби) можна вводити або

одночасно, або окремо (наприклад, послідовно протягом певного періоду часу).

Антитіло за даним розкриттям можна вводити в комбінації з лікарським препаратом для запобігання або контролю втоми, нудоти, пропасниці, кашлю, блювоти, гіперкальціємії, головного болю, закрепу, болю у кістках, ознобу, діареї, пневмонії, анемії, дисгевзії, гіпокаліємії, гарячки та гіперглікемії.

В іншому варіанті здійснення лікарський препарат для запобігання або контролю втоми, нудоти, пропасниці, кашлю, блювоти, гіперкальціємії, головного болю, закрепу, болю у кістках, ознобу, діареї, пневмонії, анемії, дисгевзії, гіпокаліємії, гарячки та гіперглікемії можна вводити до лікування за допомогою антитіла.

У контексті даного розкриття лікар може оцінювати реакцію захворювання на терапію та, таким чином, адаптувати схему введення.

Усюди в даній заявці термін "що містить" слід інтерпретувати як такий, що охоплює всі спеціально згадані ознаки, а також необов'язкові, додаткові, не вказані ознаки. Як застосовується в даному документі, застосування терміну "що включає" також розкриває варіант здійснення, в якому немає ознак інших, ніж спеціально згадані (тобто "що складається з").

Без обмеження даного розкриття, низка варіантів здійснення даного розкриття додатково показана нижче з метою ілюстрації:

Пункт 1. В одному варіанті здійснення розкритий спосіб лікування пацієнта з рецидивною і/або резистентною множинною мієломою, який передбачає введення пацієнту антитіла, що специфічно зв'язує CD38, де зазначене антитіло вводять пацієнту в безпечній терапевтичній дозі 20 мг/кг або менше.

Пункт 2. В іншому варіанті здійснення розкрита фармацевтична композиція, яка містить антитіло, що специфічно зв'язує CD38, для застосування як лікарського препарату в лікуванні рецидивної і/або резистентної множинної мієломи, де зазначене антитіло має вводитися суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі приблизно 20 мг/кг або менше.

Пункт 3. В іншому варіанті здійснення в даному документі розкритий спосіб або фармацевтична композиція за пунктами 1 або 2, де антитіло здатне знищувати CD38<sup>+</sup> клітину в суб'єкті-людині шляхом індукування апоптозу, антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) та комплемент-залежної цитотоксичності (CDC).

Пункт 4. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-3, де пацієнт має щонайменше один стан, вибраний з групи, що складається з (а) вимірюваного рівня М-білка у сироватці більше ніж приблизно 0,5 г/дл, (б) рівня М-білка у сечі більше ніж приблизно 200 мг (24-годинна сеча), (с) підвищеного рівня вільних легких ланцюгів (FLC) у сироватці більше ніж приблизно 10 мг/дл з аномальним співвідношенням FLC, та їх комбінації.

Пункт 5. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-4, де зазначене антитіло містить щонайменше один важкий ланцюг та щонайменше один легкий ланцюг, де зазначений важкий ланцюг містить три послідовні ділянки, що визначають комплементарність (CDR), з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 13, 37 та 15, та де зазначений легкий ланцюг містить три ділянки, що визначають комплементарність (CDR), з амінокислотними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 16, 17 та 18.

Пункт 6. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-5, де зазначене антитіло містить щонайменше один важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 50, та щонайменше один легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 52.

Пункт 7. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-6, де безпечна терапевтична доза становить від приблизно 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг.

Пункт 8. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-6, де безпечна терапевтична доза становить приблизно 5 мг/кг, або приблизно 10 мг/кг, або приблизно 20 мг/кг.

Пункт 9. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-8, де безпечну терапевтичну дозу зазначеного антитіла вводять внутрішньовенно.

Пункт 10. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-9, де безпечну терапевтичну дозу зазначеного антитіла вводять один раз на тиждень або один раз на кожні два тижні.

Пункт 11. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де безпечну терапевтичну дозу приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг вводять один раз на кожні два тижні.

5 Пункт 12. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де безпечну терапевтичну дозу приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг вводять один раз щотижня.

10 Пункт 13. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-12, де безпечну терапевтичну дозу зазначеного антитіла вводять за початкової швидкості інфузії в діапазоні від приблизно 0,042 мг/год. до приблизно 250 мг/год.

Пункт 14. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-13, де антитіло вводять у комбінації з дексаметазоном.

15 Пункт 15. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-14, де зазначене антитіло не спричиняє продукування аутоантитіл проти зазначеного антитіла при введенні суб'єкту-людині з дозою приблизно 20 мг/кг або менше.

20 Пункт 16. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне проявляти виявлювану зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкті-людині при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 1 мг/кг кожні два тижні.

25 Пункт 17. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне проявляти щонайменше приблизно 84,1 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкті-людині при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг кожні два тижні.

30 Пункт 18. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне проявляти щонайменше приблизно 97,7 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкті-людині при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг кожні два тижні.

35 Пункт 19. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне інгібувати ріст пухлини у суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 5 мг/кг до приблизно 20 мг/кг кожні два тижні.

40 Пункт 20. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне інгібувати ріст пухлини в суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 5 мг/кг до приблизно 20 мг/кг щотижня.

Пункт 21. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне інгібувати ріст пухлини у суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 10 мг/кг до приблизно 20 мг/кг кожні два тижні.

45 Пункт 22. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкриті спосіб або фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зазначене антитіло здатне інгібувати ріст пухлини в суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 10 мг/кг до приблизно 20 мг/кг щотижня.

Пункт 23. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкрита одинична лікарська форма, що містить фармацевтичну композицію за будь-яким з пунктів 1-22.

50 Пункт 24. В іншому варіанті здійснення в даному документі також розкритий продукт виробництва, що містить фармацевтичну композицію за будь-яким з пунктів 1-22 та контейнер.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

У SEQ ID NO: 1-3 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB13".

У SEQ ID NO: 4-6 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB13".

55 У SEQ ID NO: 7-9 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB18".

У SEQ ID NO: 10-12 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB18".

У SEQ ID NO: 13-15 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB19".

У SEQ ID NO: 16-18 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB19".

У SEQ ID NO: 19-21 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB30".

60 У SEQ ID NO: 22-24 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB30".

У SEQ ID NO: 25-27 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB31".

У SEQ ID NO: 28-30 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB31".

У SEQ ID NO: 31-33 показана послідовність CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H антитіла "38SB39".

У SEQ ID NO: 34-36 показана послідовність CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L антитіла "38SB39".

У SEQ ID NO: 37 показана послідовність CDR2-H гуманізованого антитіла "38SB19". У SEQ ID NO: 38-43 показані послідовності VL антитіл.

У SEQ ID NO: 44-49 показані послідовності VH антитіл.

У SEQ ID NO: 50-51 показані послідовності VH гуманізованих антитіл.

У SEQ ID NO: 52-55 показані послідовності VL гуманізованих антитіл.

У SEQ ID NO: 56-61 показані послідовності праймерів, які застосовували для ПЛР-реакції з виродженими праймерами першого раунду, для клонування та секвенування легкого та важкого ланцюгів антитіла до CD38.

У SEQ ID NO: 62-63 показані праймери для мишачих лідерних послідовностей 5'-кінця, застосовані для ПЛР-реакцій другого раунду з 38SB19 для клонування та секвенування легкого та важкого ланцюгів антитіла до CD38.

Дане розкриття буде далі проілюстроване за допомогою наступним прикладів.

#### ПРИКЛАД 1

Автори даного винаходу визначали для антитіла hu38SB19 придатну для введення дозу та схему, щоб одержати лікування раку з доброю переносимістю, що дозволяє лікувати пацієнтів, які страждають на CD38<sup>+</sup> гематологічне злоякісне новоутворення, конкретно, на множинну мієлому, більш конкретно, на рецидивну і/або резистентну множинну мієлому.

Таким, чином, наступний приклад розкриває результати клінічних випробувань фази 1, що демонструють безпечну терапевтичну дозу цього специфічного антитіла до CD38, hu38SB19, для ефективного лікування CD38<sup>+</sup> гематологічного злоякісного новоутворення, такого як множинна мієлома в людини.

#### Пацієнти

Загалом 32 пацієнтів піддавали лікуванню в цьому дослідженні. 40,6 % популяції були жінками; середній вік становив 64,8 (±8,8). Індекс Карновського був вищим за 60 % в усіх пацієнтів.

32 пацієнти включали 3 пацієнтів з В-клітинною неходжкінською лімфомою (NHL), 2 з хронічним лімфоцитарним лейкозом (CLL) та 27 з множинною мієломою (MM).

80,0 % пацієнтів з множинною мієломою були жінками з середнім віком 63,6 (±8,0). Пацієнти з множинною мієломою одержували як попередню протиракову терапію бортезоміб у 100 %, леналідомід у 92,6 % та аутологічну трансплантацію стовбурових клітин (ASCT) у 81,5 % випадків.

#### Способи

Некон'юговане гуманізоване IgG1 моноклональне антитіло (mAb) hu38SB19 вводили як IV інфузію монотерапевтичного засобу щотижня (QW) або кожні 2 тижні (Q2W) дорослим пацієнтам з вибраними CD38<sup>+</sup> гематологічними злоякісними новоутвореннями, в яких спостерігалось прогресування після стандартної терапії, або для яких не існує ефективної стандартної терапії.

Режим з прискореним підвищенням дози застосовували для перших 5 рівнів дози (DL) (від 0,0001 мг/кг до 0,1 мг/кг, кожні 2 тижні), з одним пацієнтом, який підлягає оцінці, на рівень дози, поки не спостерігали рівень дози токсичності (DLT). Усі подальші рівні дози (0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг кожні 2 тижні та 10 мг/кг щотижня) вводили за класичною схемою 3+3 для підвищення дози на основі рівня дози токсичності.

32 пацієнтів були такими, які підлягають оцінці щодо визначення кінцевої точки рівня дози токсичності, та 32 щодо визначення відповіді пухлини.

Медіанна кількість циклів була в діапазоні від 2,0 до 50,0.

#### Результати

Для всіх рівнів дози піддали лікуванню загалом 32 пацієнтів, у тому числі 3 пацієнтів з В-клітинною неходжкінською лімфомою (NHL), 2 з хронічним лімфоцитарним лейкозом (CLL) та 27 з множинною мієломою (MM).

Дослідження, що стосується рівнів дози 20 мг/кг кожні 2 тижні та дози 10 мг/кг один раз на тиждень, на даний момент аналізують, та максимальної стерпної дози вони не досягли.

Токсичності, що обмежують дозу, були обмежені інфузійними реакціями 2 ступеню під час циклу 1, при цьому 1 за DL 0,3 мг/кг та 1 за DL 3,0 мг/кг. Вони були пом'якшені шляхом застосування традиційної попередньої обробки метилпреднізоном, дифенгідраміном, ранітидином та ацетамінофеном.

Несприятливими явищами, що спостерігалися найчастіше (≥ 10 %) за всіх рівнів дози,

незалежно від зумовленості, були втома (46,9 %), нудота (31,3 %), пропасниця (28,1 %), кашель (25 %), блювання (21,9 %), гіперкальціємія (18,8 %), при цьому кожне з головного болю, закрепу, болю у кістках, ознобу та діареї спостерігалися в 15,6 % пацієнтів. Крім того, кожне з пневмонії, анемії, дисгевзії та гіпокаліємії спостерігалися в 12,5 % пацієнтів.

5 Серйозні несприятливі явища, пов'язані з терапією, включають пневмонію 3 ступеню (6,3 %), асоційовану з гарячкою (3,1 %), гіперглікемією (3,1 %), та одну інфузійну реакцію 2 ступеню (3,1 %).

3 19 пацієнтів, яких лікували за рівня дози від 1,0 мг/кг до 10 мг/кг кожні 2 тижні, 1 мав хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), 1 мав неходжкінську лімфому (NHL) та 17 мали

10 множинну мієлому (MM).  
17 пацієнтів з множинною мієломою були більш старими пацієнтами та такими, які зазнали більш інтенсивного попереднього лікування; медіанний вік становив 64 роки (діапазон: 55-74); та медіанна кількість попередніх схем лікування становила сім (діапазон: 2-14). Усі пацієнти з MM одержували раніше леналідомід та бортезоміб. Медіанний час від встановлення діагнозу до

15 першого дозування hu38SB19 складав 6, 8 року (діапазон 1,8–16,8 року).  
Відповіді у цій групі (фігура 1) згідно з критеріями для множинної мієломи від Європейської групи з трансплантації кісткового мозку (EBMT) включали 1 часткову відповідь (PR) за 1 мг/кг (n=3) та 5 мг/кг (n=3), та 1 мінімальну відповідь (MR) за рівня дози 3 мг/кг (n=6). За рівня дози 10 мг/кг продемонстровано 3 часткові відповіді (PR) та 2 випадки стабільного захворювання (SD)

20 серед 6 підданих лікуванню пацієнтів з множинною мієломою.  
Для 19 пацієнтів, підданих лікуванню, за DL 1 мг/кг або вище медіанний час лікування становив 8 тижнів (діапазон 2-50 тижнів).

Дослідження імунотоксичності не продемонстрували антитіла до hu38SB19.

25 Зайнятість рецепторів можна було виявляти, починаючи з рівня дози 1 мг/кг, та вона сягала діапазону 84,1-97,7 % за 10 мг/кг.

Фармакокінетичний аналіз (ПК) показав більше ніж дозо-пропорційне збільшення впливу в діапазоні доз 0,03-10 мг/кг з кліренсом в аналогічному діапазоні від 5 мг/кг до 10 мг/кг.

Жодної кумуляції не спостерігали, виходячи з  $C_{max}$  при циклі 2 у діапазоні доз 0,03-3 мг/кг.

30 Пороговий рівень інгібування росту пухлини досягався при  $C_{max}$  для 1 пацієнта за DL 5 мг/кг та для 5 пацієнтів за DL 10 мг/кг.

Антитіло до CD38 hu38SB19 продемонструвало обнадійливу активність монотерапевтичного засобу в пацієнтів з рецидивною і/або резистентною множинною мієломою, що піддавалася інтенсивному попередньому лікуванню.

35 Зміст усіх процитованих посилань (у тому числі посилань на літературні джерела, патенти, патентні заявки та веб-сайти), які можуть цитуватися по всій цій заявці або наведені нижче, тим самим явно включений в дане розкриття шляхом посилання в їхній повноті для будь-якої цілі. У даному розкритті можна використовувати, якщо не вказане інше, традиційні методики імунології, молекулярної біології та клітинної біології, які добре відомі з рівня техніки.

#### 40 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування суб'єкта-людини з рецидивною і/або резистентною множинною мієломою, який передбачає введення суб'єкту-людині антитіла, що специфічно зв'язує CD38, де

45 зазначене антитіло містить щонайменше один важкий ланцюг та один легкий ланцюг; зазначений важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 50;

зазначений легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 52; зазначене антитіло здатне вбивати клітини CD38+ у суб'єкта-людини шляхом індукції апоптозу, антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) та комплемент-залежної цитотоксичності (CDC); і зазначене антитіло вводять суб'єкту-людині в безпечній терапевтичній дозі 10 мг/мг або 20 мг/кг один раз кожні два тижні.

2. Спосіб за п. 1, де суб'єкт-людина має щонайменше один стан, вибраний з групи, що складається з

55 а) вимірюваного рівня М-білка у сироватці більше ніж приблизно 0,5 г/дл,

б) рівня М-білка у сечі більше ніж приблизно 200 мг (24-годинна сеча),

с) підвищеного рівня вільних легких ланцюгів (FLC) у сироватці більше ніж приблизно 10 мг/дл з аномальним співвідношенням FLC, та їх комбінації.



3. Спосіб за п. 1 або 2, де безпечну терапевтичну дозу зазначеного антитіла вводять внутрішньовенно.
4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, де безпечну терапевтичну дозу зазначеного антитіла вводять з початковою швидкістю інфузії в діапазоні від приблизно 0,042 мг/год. до приблизно 250 мг/год.
- 5 5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де антитіло вводять у комбінації з дексаметазоном.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, де зазначене антитіло не спричиняє продукування аутоантитіл проти зазначеного антитіла при введенні суб'єкту-людині в дозі 10 мг/кг або 20 мг/кг один раз кожні два тижні.
- 10 7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, де зазначене антитіло здатне проявляти щонайменше приблизно 84,1 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг один раз кожні два тижні.
- 15 8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, де зазначене антитіло здатне проявляти щонайменше приблизно 97,7 % зайнятість рецепторів CD38 у суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози приблизно 10 мг/кг або приблизно 20 мг/кг один раз кожні два тижні.
- 20 9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, де зазначене антитіло здатне інгібувати ріст пухлини в суб'єкта-людини при введенні зазначеному суб'єкту-людині з рівнем дози в діапазоні від приблизно 10 мг/кг до приблизно 20 мг/кг один раз кожні два тижні.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Санофі  
 <120> Специфічні антитіла до CD38 для лікування форм раку людини  
 <130> 562803  
 <160> 63  
 <170> PatentIn версія 3.5

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 1  
 Ser Tyr Gly Met Asn  
 1 5

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 2  
 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 3  
 Arg Gly Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 4  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr Gly Asn Gly Phe Met Asn  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 5  
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 6

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 5  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 7

Asn Ser Gly Met Asn  
 1 5

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 8

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 9  
 <211> 5  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 9

Arg Gly Phe Val Tyr  
 1 5

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Leu Lys  
 1 5 10 15

<210> 11  
 <211> 7  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 13

Asp Tyr Trp Met Gln  
 1 5

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 14

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 15

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 11  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val Val Ala  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 7  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile  
 1 5

<210> 18

<211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 19

Gly Ser Trp Met Asn  
 1 5

<210> 20  
 <211> 17  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 20

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe Arg  
 1 5 10 15

Asp

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 21

Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 7  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 23

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9

<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 24

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 5  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 25

Ser Tyr Thr Leu Ser  
1 5

<210> 26  
<211> 17  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 26

Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 27  
<211> 8  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 27

Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe  
1 5

<210> 28  
<211> 11  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 29  
<211> 7  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1 5

<210> 30  
<211> 9  
<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 30

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 31

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 31

Asn Phe Gly Met His  
1 5

<210> 32

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 32

Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 33

Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 35

Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser  
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 37

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 37

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 38

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr  
20 25 30

Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn  
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

<210> 39

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<400> 39

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr  
20 25 30



Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn  
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

<210> 40  
<211> 108  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 40

Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 41  
<211> 108  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ile Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg  
100 105

<210> 42  
<211> 108  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 42

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 43  
<211> 108  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
85 90 95  
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 44  
<211> 114  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 44

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110  
Ser Ala

<210> 45  
<211> 114  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 45

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15  
 Thr val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ala

<210> 46  
 <211> 120  
 <212> БИЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 46

Gln val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 47  
 <211> 119  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe  
 50 55 60  
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 48  
 <211> 117  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus sp.

<400> 48

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 49  
<211> 120  
<212> БІЛОК  
<213> Mus sp.

<400> 49

Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 50  
<211> 120  
<212> БІЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 51  
<211> 117  
<212> БИЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 52  
<211> 108  
<212> БИЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 53  
<211> 108  
<212> БИЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 54  
<211> 108  
<212> БИЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala



20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 55  
<211> 108  
<212> БІЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100

<210> 56  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 56  
ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttaggc

36

<210> 57

<211> 32  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер  
 <400> 57  
 ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca

32

<210> 58  
 <211> 32  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (13)..(13)  
 <223> s являє собою g або c

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (15)..(15)  
 <223> g являє собою a або g

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n являє собою a, c, g або t

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (19)..(19)  
 <223> m являє собою a або c

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (25)..(25)  
 <223> s являє собою g або c

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (28)..(28)  
 <223> s являє собою g або c

<400> 58  
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc

32

<210> 59  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер

<220>  
 <221> інша\_ознака

<222> (13)..(13)  
<223> s являє собою g або c

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (15)..(15)  
<223> r являє собою a або g

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (18)..(18)  
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (19)..(19)  
<223> m являє собою a або c

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (25)..(25)  
<223> s являє собою g або c

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (28)..(28)  
<223> s являє собою g або c

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (33)..(33)  
<223> w являє собою a або t

<400> 59  
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 60  
<211> 31  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (10)..(10)  
<223> u являє собою a або g

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (17)..(17)  
<223> m являє собою a або c

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (19)..(19)  
<223> s являє собою g або c

<220>

<221> інша\_ознака  
<222> (22)..(22)  
<223> т являє собою а або с

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (25)..(25)  
<223> г являє собою а або г

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (26)..(26)  
<223> в являє собою а або т

<220>  
<221> інша\_ознака  
<222> (29)..(29)  
<223> т являє собою а або с

<400> 60  
ggagctcgaу attgtgmtsa смсарwctmc а 31

<210> 61  
<211> 46  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 61  
tataгagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggтgc 46

<210> 62  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

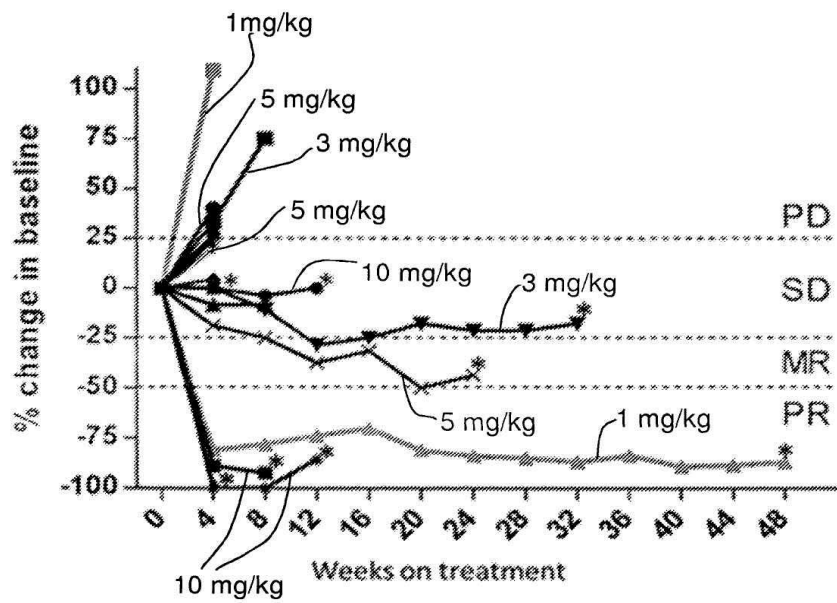
<220>  
<223> праймер

<400> 62  
atggagtcac agattcaggt с 21

<210> 63  
<211> 32  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 63  
ttttgaattc cagtaacttc aggtgtccac tc 32



Фиг. 1

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601