



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122212

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2017 03276</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Локгорст Генк М. (NL), Мутис Туна (NL), Нейгоф Інгер С. (NL), Ван де Донк Нілс В. (NL)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>08.09.2015</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці):	<b>ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК., 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, United States of America (US)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	<b>13.10.2020</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>62/047,877, 62/087,287</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>US 7 223 397 B1, 29.05.2007 DE WEERS M. et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. The journal of immunology, 2011, Vol. 186, no. 3, P. 1840 – 1848 ZHIOIANG LIU et al. Induction of chemoresistance by all-trans retinoic acid via a noncanonical signaling in multiple myeloma cells. Plos ONE, 2014, Vol. 9, no. 1, P.1932 – 6203</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>09.09.2014, 04.12.2014</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>28.08.2017, Бюл.№ 16</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію:	<b>12.10.2020, Бюл.№ 19</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2015/048899, 08.09.2015</b>		

**(54) ВИД КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПІЇ З ЗАСТОСУВАННЯМ АНТИТІЛА ДО CD38****(57) Реферат:**

Винахід стосується видів комбінованої терапії з застосуванням антитіл до CD38 і повністю транс-ретиноевої кислоти.

UA 122212 C2



## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ ВІДНОСИТЬСЯ ВІНАХІД

Цей винахід стосується видів комбінованої терапії з застосуванням антитіл до CD38 і повністю транс-ретиноевої кислоти.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

В-клітинні злоякісні новоутворення включають В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз, лімфому з клітин зони мантиї, лімфому Беркітта, фолікулярну лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому, множинну мієлому, ходжкінську лімфому, волосатоклітинний лейкоз, первинну ексудативну лімфому й неходжкінську лімфому, пов'язану зі СНІД. В-клітинні злоякісні новоутворення становлять більш ніж 85 % від діагностованих лімфом.

Множинна мієлома (ММ) являє собою В-клітинне злоякісне новоутворення, яке характеризується латентним накопиченням секреторних плазматичних клітин у кістковому мозку з низьким індексом проліферації й подовженою тривалістю життя. Захворювання врешті вражає кістки й кістковий мозок, призводячи до появи множинних пухлин і уражень по всій скелетній системі. Приблизно 1 % усіх ракових захворювань і трохи більш ніж 10 % усіх злоякісних гематологічних новоутворень можна віднести до ММ. Захворюваність на ММ зростає серед людей похилого віку, при цьому медіана віку на момент діагностування становить приблизно 61 рік.

CD38 являє собою мембранний білок II типу, який виконує функцію в опосередкованій рецепторами адгезії й передачі сигналів, а також опосередковує мобілізацію кальцію через його ектоферментативну активність, каталізуючи утворення циклічної АДФ-рибози (цАДФР) із НАД<sup>+</sup> і гідролізуючи цАДФР до АДФ-рибози (АДФР). CD38 опосередковує секрецію цитокінів, активацію й проліферацію лімфоцитів (Funaro et al., J Immunology 145:2390-6, 1990; Terhorst et al., Cell 77:1-80, 1981; Guse et al., Nature 398:70-3, 1999) і за допомогою своєї глікогідролазної активності щодо НАД регулює позаклітинні рівні НАД<sup>+</sup>, залучені до модулювання компартменту регуляторних Т-клітин (Adriouch et al., 14:1284-92, 2012; Chiarugi et al., Nature Reviews 12:741-52, 2012).

CD38 експресується на злоякісних плазматичних клітинах ММ і присутній у різноманітних злоякісних гематологічних новоутвореннях.

Доступні сьогодні види терапії ММ включають хіміотерапію, трансплантацію стовбурових клітин, лікування препаратами Thalomid® (талідомід), Revlimid® (леналідомід), Velcade® (бортезоміб), Aredia® (памідронат) і Zometa® (золедронові кислота). Чинні протоколи лікування, які включають комбінування хіміотерапевтичних агентів, таких як вінкрестин, кармустин (BCNU), мелфалан, циклофосфамід, адріаміцин і преднізон або дексаметазон, забезпечують повну ремісію лише в приблизно 5 % пацієнтів. Медіана виживаності становить приблизно 36-48 місяців з моменту діагностування. Останні досягнення в галузі високодозової хіміотерапії з подальшою трансплантацією аутологічних моноклеарних клітин кісткового мозку (МНККМ) або периферичної крові (МНКПК) підвищили відсоток повної ремісії й тривалість ремісії, хоча загальна виживаність подовжилася лише незначно й не було отримано доказів вилікування. Зрештою, в усіх хворих на ММ трапляються рецидиви, навіть під час підтримувальної терапії тільки інтерфероном-альфа (IFN-α) або його комбінацією зі стероїдами. Таким чином, існує потреба в додаткових видах терапії для лікування множинної мієломи й інших В-клітинних злоякісних новоутворень.

## СУТЬ ВІНАХОДУ

Одним варіантом втілення винаходу є спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення пацієнтові, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, in vitro шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ).

## КОРОТКИЙ ОПИС РИСУНКІВ

На Фіг. 1А продемонстровано, що повністю транс-ретиноева кислота (ПТРК) підвищує експресію CD38 на клітинних лініях множинної мієломи (ММ) дозозалежним чином. Клітинні лінії ММ RPMI8226, UM9 і XG1 інкубували в середовищі RPMI-1640 окремо або разом з 0-25 нМ ПТРК протягом 48 годин і після цього збирали для визначення експресії CD38 шляхом проточної цитометрії. На графіку показано результати одного репрезентативного експерименту. По вісі Y відкладено кратність підвищення середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) поверхневої експресії CD38.

На Фіг. 1В продемонстровано, що ПТРК підвищує експресію CD38 на клітинних лініях ММ часозалежним чином. Клітинні лінії ММ RPMI8226, UM9 і XG1 інкубували в середовищі RPMI-1640 окремо або разом з 10 нМ ПТРК протягом 24, 48, 72 або 96 годин і після цього збирали для

визначення експресії CD38 шляхом проточної цитометрії. На графіку показано результати одного репрезентативного експерименту. По вісі Y відкладено кратність підвищення середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) поверхневої експресії CD38.

На Фіг. 2 продемонстровано, що ПТРК підвищує експресію CD38 на моноклеарних клітинах кісткового мозку (МНKKM), взятих у хворих на MM, *ex vivo*. МНKKM від 26 хворих на MM інкубували в середовищі RPMI-1640 окремо або разом з 10 нМ ПТРК протягом 48 годин і після цього збирали для визначення експресії CD38 шляхом проточної цитометрії. По вісі Y відкладено значення СІФ поверхневої експресії CD38. "Середовище" — середовище в 0 годин; "нз" — незначна; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

На Фіг. 3А показана індукована даратумумабом комплементзалежна цитотоксичність (КЗЦ) (верхній графік) і антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (АЗКЦ) (нижній графік) у клітинній лінії MM XG1, яка проходила попередню обробку з використанням або без використання 10 нМ ПТРК протягом 48 годин перед індукуванням КЗЦ або АЗКЦ у присутності 10 мкг/мл даратумумабу. По вісі Y відкладено відсоток (%) КЗЦ або АЗКЦ. Дані демонструють середні значення й стандартну помилку середнього (SEM) принаймні трьох експериментів. Р-значення між вказаними групами обчислювали з використанням *t*-критерію Стьюдента для залежних вибірок. "Дара" — даратумумаб; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

На Фіг. 3В показана індукована даратумумабом КЗЦ (верхній графік) і АЗКЦ (нижній графік) у клітинній лінії MM RPMI8226, яка проходила попередню обробку з використанням або без використання 10 нМ ПТРК протягом 48 годин перед індукуванням КЗЦ або АЗКЦ у присутності 10 мкг/мл даратумумабу. По вісі Y відкладено відсоток (%) КЗЦ або АЗКЦ. Дані демонструють середні значення й SEM принаймні трьох експериментів. Р-значення між вказаними групами обчислювали з використанням *t*-критерію Стьюдента для залежних вибірок. "Дара" — даратумумаб; "нз" — незначна.

На Фіг. 3С показана індукована даратумумабом КЗЦ (верхній графік) і АЗКЦ (нижній графік) у клітинній лінії MM UM9, яка проходила попередню обробку з використанням або без використання 10 нМ ПТРК протягом 48 годин перед індукуванням КЗЦ або АЗКЦ у присутності 10 мкг/мл даратумумабу. По вісі Y відкладено відсоток (%) КЗЦ або АЗКЦ. Дані демонструють середні значення й SEM принаймні трьох експериментів. Р-значення між вказаними групами обчислювали з використанням *t*-критерію Стьюдента для залежних вибірок. "Дара" — даратумумаб; \* $p < 0,05$ ; "нз" — незначна.

На Фіг. 4А продемонстровано, що попередня обробка первинних клітин MM протягом 48 годин із використанням 10 нМ ПТРК посилює опосередковану даратумумабом КЗЦ первинних клітин MM. Клітини MM попередньо обробляли протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 0-10 мкг/мл. На графіку показано об'єднані результати для зразків 16 хворих. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . "ДАРА" — даратумумаб.

На Фіг. 4В продемонстровано, що попередня обробка первинних клітин MM протягом 48 годин із використанням 10 нМ ПТРК посилює опосередковану даратумумабом АЗКЦ первинних клітин MM. Клітини MM попередньо обробляли протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 0-10 мкг/мл. На графіку показано об'єднані результати для зразків 13 хворих. \* $p < 0,05$ . "ДАРА" — даратумумаб.

На Фіг. 5А показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин MM, взятих у хворого 1 і хворого 2, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 5В показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин MM, взятих у хворого 3 і хворого 4, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 5С показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин MM, взятих у хворого 5 і хворого 6, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 5D показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин MM, взятих у хворого 7 і хворого 8, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 5Е показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин MM, взятих у хворого 9 і хворого 10, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 5F показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 11 і хворого 12, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

5 На Фіг. 5G показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 13 і хворого 14, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

10 На Фіг. 5H показані результати КЗЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 15 і хворого 16, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

15 На Фіг. 6A показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 3 і хворого 4, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

20 На Фіг. 6B показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 7 і хворого 8, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 6C показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 9 і хворого 10, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

25 На Фіг. 6D показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 14 і хворого 15, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

30 На Фіг. 6E показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 16 і хворого 17, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

35 На Фіг. 6F показані результати АЗКЦ *in vitro* первинних клітин ММ, взятих у хворого 18, попередньо оброблюваних протягом 48 годин із використанням або без використання 10 нМ ПТРК, як зазначено на фігурі, за концентрацій даратумумабу в діапазоні 1-10 мкг/мл.

На Фіг. 7 показані рівні експресії CD38 на МНКМ, взятих у хворих на ММ, до й після інкубування клітин у присутності (чорні смуги) або у відсутності (білі смуги) 10 нМ ПТРК. Зразки від того самого пацієнта використовували в аналізах АЗКЦ й КЗЦ, як показано на Фіг. 4A, 4B, 5 і 6.

40 На Фіг. 8A показане індуковане ПТРК зниження експресії CD55, CD59 і CD46 на клітинах RPMI8226 після 48-годинного інкубування клітин з використанням 0-25 нМ ПТРК. СІФ — середня інтенсивність флуоресценції. Експресію CD55, CD59 і CD46 оцінювали з використанням проточної цитометрії. Верхній графік: СІФ — нижній графік: кратність зміни СІФ у порівнянні з контролем.

45 На Фіг. 8B показане індуковане ПТРК зниження експресії CD55, CD59 і CD46 на клітинах UM9 після 48-годинного інкубування клітин з використанням 0-25 нМ ПТРК. СІФ — середня інтенсивність флуоресценції. Експресію CD55, CD59 і CD46 оцінювали з використанням проточної цитометрії. Верхній графік: СІФ — нижній графік: кратність зміни СІФ у порівнянні з контролем.

50 На Фіг. 8C показане індуковане ПТРК зниження експресії CD55, CD59 і CD46 на клітинах XG1 після 48-годинного інкубування клітин з використанням 0-25 нМ ПТРК. СІФ — середня інтенсивність флуоресценції. Експресію CD55, CD59 і CD46 оцінювали з використанням проточної цитометрії. Верхній графік: СІФ — нижній графік: кратність зміни СІФ у порівнянні з контролем.

55 На Фіг. 9A показане індуковане ПТРК зниження експресії CD55 на первинних клітинах ММ після 48-годинного інкубування клітин з використанням (сірі смуги) або без використання (чорні смуги) 10 нМ ПТРК, як зазначено. \*  $p=0,019$ .

60 На Фіг. 9B показане індуковане ПТРК зниження експресії CD59 на первинних клітинах ММ після 48-годинного інкубування клітин з використанням (сірі смуги) або без використання (чорні смуги) 10 нМ ПТРК, як зазначено. \*\*  $p=0,0047$ .

На Фіг. 9С показаний вплив ПТРК на експресію CD46 на первинних клітинах ММ після 48-годинного інкубування клітин з використанням (сірі смуги) або без використання (чорні смуги) 10 нМ ПТРК, як зазначено; "нз" — незначний.

На Фіг. 10А показана експресія CD55 на первинних клітинах ММ, взятих у 16 хворих на ММ, після 48-годинного інкубування клітин з використанням (чорні смуги) або без використання (білі смуги) 10 нМ ПТРК. Зразки від тих самих пацієнтів використовували в аналізах КЗЦ, як показано на Фіг. 5.

На Фіг. 10В показана експресія CD59 на первинних клітинах ММ, взятих у 16 хворих на ММ, після 48-годинного інкубування клітин з використанням (чорні смуги) або без використання (білі смуги) 10 нМ ПТРК. Зразки від тих самих пацієнтів використовували в аналізах КЗЦ, як показано на Фіг. 5.

На Фіг. 10С показана експресія CD46 на первинних клітинах ММ, взятих у 16 хворих на ММ, після 48-годинного інкубування клітин з використанням (чорні смуги) або без використання (білі смуги) 10 нМ ПТРК. Зразки від тих самих пацієнтів використовували в аналізах КЗЦ, як показано на Фіг. 5.

На Фіг. 11 продемонстровано, що ПТРК покращує відповідь на даратумумаб у мишачій моделі гуманізованої множинної мієломи. Мишам Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>, які були носіями каркасів, вкритих мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), проводили інокуляцію трансдукованих люциферазою клітин ХG1. Миші отримували лікування контролем, ПТРК плюс без-Т-клітинними МНКПК (МНКПК-Т) у якості ефекторних клітин, даратумумабом плюс МНКПК-Т або даратумумабом плюс ПТРК плюс МНКПК-Т, і ріст трансдукованих клітин ХG1 відстежували кожного тижня шляхом біolumінесцентної візуалізації (BLI). На фігурі показане пухлинне навантаження на групу лікування, по 4 миші в групі, і кожна з мишей має 4 каркаси. Статистичні відмінності між мишами, які отримували лікування даратумумабом, і мишами, які отримували лікування даратумумабом плюс ПТРК, обчислювали з використанням U-критерію Манна-Уїтні. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001; "нз" — незначна.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

"CD38" відноситься до білка CD38 людини (синоніми: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФР-гідролаза 1, циклічна АДФ-рибоза-гідролаза 1). CD38 людини має амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 1

У контексті цього документа термін "антитіла" використовується в широкому значенні й включає молекули імуноглобуліну, у тому числі моноклональні антитіла, у тому числі мишачі, людські, адаптовані до людини, гуманізовані й химерні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл, біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, димерні, тетрамерні або мультимерні антитіла й одноланцюгові антитіла.

Імуноглобуліни можна віднести до п'яти основних класів, а саме IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, залежно від амінокислотної послідовності константного домену важких ланцюгів. IgA і IgG додатково поділяють на ізотипи IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> і IgG<sub>4</sub>. Легкі ланцюги антитіл будь-якого виду хребетних можна віднести до одного з двох чітко відмінних типів, а саме каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотних послідовностей їхніх константних доменів.

У контексті цього документа термін "фрагменти антитіл" стосується частини молекули імуноглобуліну, яка зберігає антигензв'язуючий сайт важких ланцюгів і/або легких ланцюгів, наприклад областей, що визначають комплементарність, важких ланцюгів (HCDR) 1, 2 і 3, областей, що визначають комплементарність, легких ланцюгів (LCDR) 1, 2 і 3, варіабельної області важких ланцюгів (VH) або варіабельної області легких ланцюгів (VL). Фрагменти антитіла включають фрагмент Fab; одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CHI; фрагмент F(ab)<sub>2</sub>; двовалентний фрагмент, що містить два фрагменти Fab, зв'язані дисульфідним містком у шарнірній ділянці; фрагмент Fd, що складається з доменів VH і CHI; фрагмент Fv, що складається з доменів одного плеча антитіла; фрагмент доменного антитіла (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), що складається з домену VH. Домени VH і VL можуть бути сконструйовані й зв'язані один з одним за допомогою синтетичного лінкера з утворенням різних типів конструкцій одноланцюгових антитіл, де домени VH/VL паруються внутрішньомолекулярно або міжмолекулярно в тих випадках, коли домени VH і VL експресуються окремими конструкціями одноланцюгових антитіл з утворенням одновалентного антигензв'язуючого сайту, наприклад одноланцюговим Fv (ScFv) або діатілом; описані, наприклад, у міжнародних патентних публікаціях №№ WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 і WO1992/01047. Ці фрагменти антитіл отримують з використанням добре відомих фахівцям у цій галузі способів, і проводять скринінг цих фрагментів на корисність у такий самий спосіб, що й для повнорозмірних антитіл.

У контексті цього документа термін "виділене антитіло" означає антитіло або фрагмент антитіла, який по суті не містить інших антитіл, що мають відмінні антигенні властивості (наприклад, антитіло, яке специфічно зв'язується з CD38). Однак виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CD38, може мати перехресну реактивність до інших антигенів, таких як ортологи людського CD38, наприклад CD38 *Macaca fascicularis* (яванського макака). Крім того, виділене антитіло може по суті не містити іншого клітинного матеріалу й/або хімічних речовин.

Варіабельна область антитіла складається з області "каркаса", що переривається трьома "антигензв'язуючими сайтами". Антигензв'язуючі сайти визначаються з використанням різних термінів: області, що визначають комплементарність (CDR), три у VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) і три у VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основі варіабельності послідовностей (Wu and Kabat J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); "Гіперваріабельні області", "HVR" або "HV", три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3), відносяться до областей варіабельних доменів антитіл, які мають гіперваріабельну структуру за визначенням Chothia and Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987). Інші терміни включають IMGT-CDR (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) і "використання залишку, який визначає специфічність" (SDRU) (Almagro, Mol Recognit 17:132-43, 2004). Міжнародна база даних ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) пропонує стандартизовану нумерацію й визначення антигензв'язуючих сайтів. Відповідність між визначеннями CDR, HV і IMGT описана в публікації Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

У контексті цього документа "залишки Chothia" є залишками VL і VH антитіл, пронумерованих відповідно до Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273:927-48, 1997).

"Каркас" або "каркасні послідовності" — це інші послідовності варіабельної області, крім тих, які визначено як антигензв'язуючі сайти.

"Гуманізоване антитіло" стосується антитіла, у якому антигензв'язуючі сайти отримані з видів не людського походження, а каркаси варіабельної області отримано з послідовностей імунoglobуліну людини. Гуманізовані антитіла можуть включати заміщення в каркасі, так що каркас може не бути точною копією експресованого людського імунoglobуліну або генних послідовностей зародкової лінії.

"Адаптовані до людини" антитіла або "адаптовані до каркаса людського походження" антитіла (HFA) стосуються гуманізованих антитіл, адаптованих згідно зі способами, описаними в публікації патенту США № US2009/0118127. Адаптовані до людини антитіла гуманізують шляхом відбору акцепторних каркасів людини на основі максимальної схожості CDR і FR, сумісності довжини й схожості послідовностей петель CDR1 і CDR2 і частини петель CDR3 легкого ланцюга.

Термін "людське антитіло" означає антитіло, що має варіабельні області важкого й легкого ланцюгів, у яких каркас і антигензв'язуючі сайти отримані з послідовностей людського походження. Якщо антитіло містить константну область, цю константну область також отримують із послідовностей людського походження.

Людське антитіло містить варіабельні області важкого або легкого ланцюга, які "отримані з" послідовностей людського походження, якщо варіабельні області антитіла отримують із системи, у якій використовуються гени імунoglobулінів зародкової лінії людини або перебудованих імунoglobулінів. Такі системи включають бібліотеки генів імунoglobулінів людини, продемонстровані на фагові, і трансгенних тварин не людського походження, наприклад мишей з локусами імунoglobуліну людини, як описано в цьому документі. Людське антитіло може містити амінокислотні відмінності порівняно з послідовностями імунoglobуліну зародкової лінії або перебудованого імунoglobуліну внаслідок, наприклад, природних соматичних мутацій або навмисного введення заміщень у каркасні або антигензв'язуючі сайти. Зазвичай амінокислотна послідовність людського антитіла принаймні приблизно на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, що кодується геном імунoglobуліну зародкової лінії або перебудованого імунoglobуліну. У деяких випадках людське антитіло може містити консенсусні каркасні послідовності, отримані з аналізу людської каркасної послідовності, наприклад як описано в публікації Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000), або синтетичну HCDR3, введену в бібліотеки генів імунoglobулінів людини, продемонстровані на фагові, наприклад як описано в публікації Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 і міжнародній патентній публікації № WO2009/085462). Антитіла, у яких антигензв'язуючі сайти отримано з видів не людського походження, не включені у визначення терміну "людське антитіло".

Виділені гуманізовані антитіла можуть бути синтетичними. Людські антитіла можуть бути отримані з використанням систем, таких як фаговий дисплей, що включає синтетичні CDR і/або

синтетичні каркаси, або можуть піддаватись мутагенезу *in vitro* для покращення властивостей антитіл.

У контексті цього документа термін "рекомбінантне антитіло" включає всі антитіла, які отримані, експресовані, створені або виділені заснованими на рекомбінації способами, такі як антитіла, виділені з організму тварини (наприклад, миші або щура), що є трансгенною або трансхромосомною для генів імуноглобуліну людини, або з гібридами, отриманої від неї (додатково описано нижче), антитіла, виділені з клітини-хазяїна, трансформованої для експресії антитіла, антитіла, виділені з рекомбінантної комбінаторної бібліотеки антитіл, і антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які включають сплайсинг послідовностей генів імуноглобуліну людини з іншими послідовностями ДНК, або антитіла, отримані *in vitro* з використанням обміну Fab-фрагментів, наприклад біспецифічні антитіла.

У контексті цього документа термін "моноклональне антитіло" стосується препарату молекул антитіл єдиної молекулярної композиції. Композиція моноклонального антитіла демонструє єдину специфічність зв'язування, реалізовану через його пару VH, VL і/або VH/VL, і афінність зв'язування з конкретним епітопом або, у разі біспецифічного моноклонального антитіла, подвійну специфічність зв'язування з двома різними епітопами.

У контексті цього документа термін "епітоп" означає частину антигена, з якою специфічно зв'язується антитіло. Епітопи, як правило, складаються з хімічно активних (наприклад, полярних, неполярних і гідрофобних) поверхневих скупчень функціональних груп, таких як амінокислоти або бічні ланцюги полісахаридів, і можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики зарядів. Епітоп може складатися з суміжних і/або несуміжних амінокислот, які утворюють конформаційну просторову одиницю. Для несуміжного епітопа амінокислоти з різних частин лінійної послідовності антигена опиняються в безпосередній близькості в 3-вимірному просторі в результаті складання білкової молекули.

Термін "різновид" у цьому документі стосується поліпептиду або полінуклеотиду, який відрізняється від еталонного поліпептиду або еталонного полінуклеотиду однією або більшою кількістю модифікацій, наприклад заміщення, інсерції або делеції.

Термін "синергія", "синергізм" або "синергічний" означає, що спостерігається більший ефект, ніж очікуваний адитивний ефект комбінації.

У контексті цього документа "у комбінації з" означає, що два або більше терапевтичних засобів можна вводити суб'єктові разом у вигляді суміші, одночасно у вигляді окремих агентів або послідовно у вигляді окремих агентів у будь-якому порядку.

Терміни "лікувати" або "лікування" стосуються терапевтичного лікування, метою якого є сповільнення (зменшення) небажаної фізіологічної зміни або захворювання, наприклад росту, розвитку або поширення пухлини або пухлинних клітин, або забезпечення сприятливого або бажаного клінічного результату під час лікування. Сприятливі або бажані клінічні результати включають полегшення симптомів, зменшення ступеня захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання, затримку або вповільнення прогресування захворювання, покращення або тимчасове полегшення стану захворювання й ремісію (часткову або повну), які можна виявити або не можна виявити. "Лікування" також може означати збільшення тривалості життя у порівнянні з очікуваною тривалістю життя суб'єкта за відсутності лікування. Суб'єкти, які потребують лікування, включають тих, хто вже має небажану фізіологічну зміну або захворювання, а також тих, хто схильний до такої фізіологічної зміни або захворювання.

"Інгібує ріст" (наприклад, стосовно клітин, таких як пухлинні клітини) означає вимірне зменшення росту клітин *in vitro* або *in vivo* після контактування з терапевтичним засобом або комбінацією терапевтичних або лікарських засобів порівняно з ростом тих самих клітин у відповідних контрольних умовах, добре відомих фахівцям у цій галузі. Інгібування росту клітин *in vitro* або *in vivo* може становити принаймні приблизно 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 100 %. Інгібування росту клітин може відбуватися за допомогою різних механізмів, наприклад шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої токсичності (АЗКЦ), антитілозалежного клітинного фагоцитозу (АЗКФ), комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), апоптозу, некрозу або інгібування проліферації клітин.

Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективною в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість може змінюватися залежно від таких факторів, як стан захворювання, вік, стать, маса тіла пацієнта й здатність терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів викликати бажану відповідь у індивідуума. Ілюстративні показники ефективного терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів включають,



наприклад, покращення стану здоров'я пацієнта, зниження пухлинного навантаження, зупинку або вповільнення росту пухлини й/або відсутність метастазування ракових клітин у інші місця в організмі.

У винаході запропоновані способи лікування хворих, які мають CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, комбінацією антитіла до CD38 і повністю транс-ретиноевої кислоти (ПТРК). Винахід ґрунтується, принаймні частково, на виявленні того факту, що ПТРК посилює опосередковану даратумумабом лізисну активність антитіл до CD38, яка реалізується через АЗКЦ й/або КЗЦ первинних клітин ММ із низьким, середнім або високим рівнем експресії CD38, шляхом посилення експресії CD38 на клітинах ММ. ПТРК також може індукувати опосередковану даратумумабом АЗКЦ й/або КЗЦ у зразках первинної ММ, які були резистентними до опосередкованої даратумумабом КЗЦ й/або АЗКЦ *in vitro* або були отримані від хворих на множинну мієлому, які попередньо отримували інтенсивне лікування й мають форму захворювання з подвійною рефрактерністю (до леналідоміду й до бортезомібу). ПТРК більшою мірою посилює опосередковану даратумумабом КЗЦ, ніж АЗКЦ, що можна пояснити виявленням того факту, що ПТРК також пригнічує експресію комплемент-інгібуючих білків CD55 і CD59.

ПТРК (CAS № 302-79-4) має добре відому молекулярну структуру.

Одним варіантом втілення винаходу, розкритим у цьому документі, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК).

Одним варіантом втілення винаходу, розкритим у цьому документі, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ).

Способи цього винаходу можна використовувати для лікування тварин, які належать до будь-якої класифікації. Приклади таких тварин включають ссавців, таких як люди, гризуни, собаки, коти й свійські тварини.

У деяких варіантах втілення винаходу, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, шляхом КЗЦ *in vitro*.

"CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення" означає злоякісне гематологічне новоутворення, яке характеризується наявністю пухлинних клітин, що експресують CD38, включаючи лейкози, лімфоми й мієлому. Прикладами таких CD38-позитивних злоякісних гематологічних новоутворень є В-клітинний лімфобластний лейкоз/лімфома з клітин-попередників і В-клітинна неходжкінська лімфома, гострий промієлоцитарний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз і В-клітинні новоутворення зі зрілих клітин, такі як В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ)/дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома (ДЛЛ), В-клітинний гострий лімфоцитарний лейкоз, В-клітинний пролімфоцитарний лейкоз, лімфоплазматична лімфома, лімфома з клітин зони мантиї (ЛКМ), фолікулярна лімфома (ФЛ), включаючи низькодиференційовану, середньодиференційовану й високодиференційовану ФЛ, шкірна лімфома з клітин фолікулярного центра, В-клітинна лімфома з клітин маргінальної зони (MALT-тип, вузловий і селезінковий тип), волосатоклітинний лейкоз, дифузна В-великоклітинна лімфома (ДВВКЛ), лімфома Беркітта (ЛБ), плазмцитом, множинна мієлома (ММ), плазмоклітинний лейкоз, посттрансплантаційне лімфопроліферативне порушення, макроглобулінемія Вальденстрема, плазмоклітинні лейкози й анапластична великоклітинна лімфома (АВКЛ).

CD38 експресується під час різних злоякісних гематологічних захворювань, включаючи множинну мієлому, лейкози й лімфоми, такі як В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз, Т- і В-клітинний гострий лімфоцитарний лейкоз, макроглобулінемію Вальденстрема, первинний системний амілоїдоз, лімфому з клітин зони мантиї, пролімфоцитарний/промієлоцитарний лейкоз, гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний мієлоїдний лейкоз, фолікулярну лімфому, лімфому Беркітта, лейкоз із великих гранулярних лімфоцитів (ВГЛ), лейкоз із НК-клітин і лейкоз із плазматичних клітин. Експресія CD38 описана для епітеліальних/ендотеліальних клітин різного походження, включаючи залозистий епітелій передміхурової залози, острівцеві клітини підшлункової залози, епітелій проток у залозах, включаючи привушну залозу, клітини бронхіального епітелію, клітини яєчка, яєчників і епітелію пухлин аденокарциноми ободової й

прямої кишки. Інші захворювання, де може бути залучена експресія CD38, включають, наприклад, бронхоепітеліальні карциноми легенів, рак молочної залози (що розвинувся зі злоякісної проліферації епітеліальної вистилки проток і часточок молочної залози), пухлини підшлункової залози, що розвинулися з  $\beta$ -клітин (інсуліноми), пухлини, що розвинулися з епітелію кишечника (наприклад, аденокарцинома й карцинома лускових клітин), карциному передміхурової залози, семіноми в яєчках і ракові захворювання яєчників. У центральній нервовій системі CD38 експресуються нейробластомами.

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому.

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВБКЛ).

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою неходжкінську лімфому.

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ).

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою фолікулярну лімфому (ФЛ).

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою лімфому Беркїтта (ЛБ).

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою лімфому з клітин зони мантиї (ЛКМ).

В одному варіанті втілення винаходу, розкритому в цьому документі, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому, гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), неходжкінську лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВБКЛ), лімфому Беркїтта (ЛБ), фолікулярну лімфому (ФЛ) або лімфому з клітин зони мантиї (ЛКМ).

Прикладами В-клітинних неходжкінських лімфом є лімфоматоїдний гранульоматоз, первинна ексудативна лімфома, внутрішньосудинна В-великоклітинна лімфома, медіастинальна В-великоклітинна лімфома, хвороби важких ланцюгів (включаючи  $\gamma$ ,  $\mu$  і  $\alpha$ -хвороби), лімфоми, викликані терапією імундепресантами, такі як лімфома, викликана циклоспорином, і лімфома, викликана метотрексатом.

В одному варіанті втілення цього винаходу, включеному в перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, порушення за участю клітин, що експресують CD38, являє собою неходжкінську лімфому.

Інші приклади порушень за участю клітин, що експресують CD38, включають злоякісні новоутворення, що походять із Т- і NK-клітин, включаючи неоплазми зі зрілих Т- і NK-клітин, включно з Т-клітинним пролімфоцитарним лейкозом, Т-клітинним лейкозом із великих гранулярних лімфоцитів, агресивним NK-клітинним лейкозом, Т-клітинним лейкозом/лімфомою дорослих, екстранодальною NK/Т-клітинною лімфомою назального типу, Т-клітинною лімфомою ентеропатичного типу, печінково-селезінковою Т-клітинною лімфомою, підшкірною панікулітоподібною Т-клітинною лімфомою, бластною NK-клітинною лімфомою, грибоподібним мікозом/синдромом Сезарі, первинними шкірними CD30-позитивними Т-клітинними лімфопроліферативними порушеннями (первинною шкірною анапластичною великоклітинною лімфомою Ш-АВКЛ, лімфоматоїдним папульозом, пограничними ураженнями), ангіоімунобластною Т-клітинною лімфомою, периферичною неуточненою Т-клітинною лімфомою й анапластичною великоклітинною лімфомою.

Приклади злоякісних новоутворень, що походять із мієлоїдних клітин, включають гострий мієлоїдний лейкоз, включаючи гострий промієлоцитарний лейкоз, і хронічні мієлопроліферативні захворювання включно з хронічним мієлоїдним лейкозом.

У способах винаходу, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, можна використовувати будь-яке антитіло до CD38.

У деяких варіантах втілення антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, in vitro шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) і/або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ).

Варіабельні області антитіл до CD38 можна отримати з існуючих антитіл до CD38 і клонувати як повнорозмірні антитіла або в складі різноманітних форматів і фрагментів антитіл із використанням стандартних способів. Ілюстративні варіабельні області, що зв'язуються з CD38, які можна використовувати, описані в міжнародних патентних публікаціях № WO05/103083, WO06/125640, WO07/042309, WO08/047242, WO12/092612, WO06/099875 і WO11/154453A1.

Ілюстративне антитіло до CD38, яке можна використовувати, являє собою даратумумаб. Даратумумаб містить амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL), продемонстровані в SEQ ID NO: 4 і 5 відповідно, CDR важкого ланцюга HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно і CDR легкого ланцюга LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно, і належить до підтипу IgG1/κ і описаний у патенті США № 7,829,693. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга даратумумабу продемонстрована в SEQ ID NO: 12, а амінокислотна послідовність легкого ланцюга продемонстрована в SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 1

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALCLGVSLVLILVVVLAVVVPWRWQQWSGPGTTKRFPETVL  
ARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLA  
HQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAE  
AACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII  
SKRNIQFSCKNYRDPKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA

ISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILWFGPEVFDYWGQ

GTLVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS  
GSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGPEVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTYADS  
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILWFGPEVFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS  
GSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGEC

Інше ілюстративне антитіло до CD38, яке можна використовувати, являє собою mAb003, яке містить послідовності VH і VL із SEQ ID NO: 14 і 15 відповідно й описане в патенті США № 7,829,693. VH і VL mAb003 можуть експресуватися як IgG1/κ.

SEQ ID NO: 14

5 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIANSAQK  
FQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPFDYWGQGTLLTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS  
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

10 Інше ілюстративне антитіло до CD38, яке можна використовувати, являє собою mAb024, яке містить послідовності VH і VL із SEQ ID NO: 16 і 17 відповідно, описане в патенті США № 7,829,693. VH і VL mAb024 можуть експресуватися як IgG1/κ.

SEQ ID NO: 16

15 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPHDSDARYSPSF  
QGQVTFADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS  
GSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

20 Інше ілюстративне антитіло до CD38, яке можна використовувати, являє собою MOR-202 (MOR-03087), яке містить послідовності VH і VL із SEQ ID NO: 18 і 19 відповідно, описане в патенті США № 8,088,896. VH і VL MOR-202 можуть експресуватися як IgG1/κ.

SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAWYGQGTLLTVSS

25 SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQQKPGQAPVLIYGD SKRPSGIPERFSGSN  
SGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGASLVFGGGTKLTVLGQ

30 Інше ілюстративне антитіло до CD38, яке можна використовувати, являє собою ізатуксимаб, що містить послідовності VH і VL із SEQ ID NO: 20 і 21 відповідно, описане в патенті США № 8,153,765. VH і VL ізатуксимабу можуть експресуватися як IgG1/κ.

SEQ ID NO 20:

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPQGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQ  
KFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSTVSS

SEQ ID NO: 21:

35 DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGS  
GAGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQHQHSPPYTFGGGKLEIK

40 Інші приклади антитіл до CD38, які можна використовувати у способах винаходу, описані в міжнародній патентній публікації № WO05/103083, міжнародній патентній публікації № WO06/125640, міжнародній патентній публікації № WO07/042309, міжнародній патентній публікації № WO08/047242 або міжнародній патентній публікації № WO14/178820.

Антитіла до CD38, які використовують у способах винаходу, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, також можуть бути вибрані de novo із бібліотеки фагового дисплея, де фаг сконструйований для експресії людських імуноглобулінів або їх частин, таких як Fab, одноланцюгові антитіла (scFv), непарні або парні варіабельні області антитіла (Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000; Krebs et al., J Immunol Meth 254:67-84, 2001; Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets et al., PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks et al., J Mol Biol 222:581, 1991). Варіабельні домени, що зв'язуються з CD38 можуть бути виділені, наприклад, із бібліотек фагового дисплея, що експресують варіабельні області важкого й легкого ланцюгів антитіла як гібридні білки з білком оболонки рІХ бактеріофага, як описано в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 і міжнародній публікації PCT № WO09/085462). Бібліотеки антитіл можна піддавати скринінгу на зв'язування з позаклітинним доменом людського CD38, отримані позитивні клони можна додатково характеризувати, виділяти з лізатів клонів Fab, а потім клонувати як повнорозмірні антитіла. Такі способи з використанням способів фагового дисплея для виділення людських антитіл визнані в цій галузі. Див., наприклад: патент США № 5,223,409; патент США № 5,403,484; і патент США № 5,571,698, патент США № 5,427,908, патент США № 5,580,717, патент США № 5,969,108, патент США № 6,172,197, патент США № 5,885,793; патент США № 6,521,404; патент США № 6,544,731; патент США № 6,555,313; патент США № 6,582,915; і патент США № 6,593,081.

Fc-фрагмент антитіла може опосередковувати ефекторні функції антитіла, такі як антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (АЗКЦ), антитілозалежний клітинний фагоцитоз (АЗКФ) або комплементзалежна цитотоксичність (КЗЦ). Такі функції можуть бути опосередковані зв'язуванням ефекторного (-их) домену (-ів) Fc із Fc-рецептором на імунній клітині з фагоцитарною або літичною активністю або зв'язуванням ефекторного (-их) домену (-ів) Fc з компонентами системи комплементу. Зазвичай ефект (-и), опосередкований (-и) Fc зв'язуючими клітинами або компонентами комплементу, призводить (-ять) до інгібування й/або виснаження клітин-мішеней, наприклад клітин, що експресують CD38. Ізотипи IgG людини IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 проявляють різну здатність до здійснення ефекторних функцій. АЗКЦ може бути опосередкована IgG1 і IgG3, АЗКФ може бути опосередкований IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, а КЗЦ може бути опосередкована IgG1 і IgG3.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 має ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 має ізотип IgG1 або IgG3.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом АЗКЦ.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення, антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом КЗЦ.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, шляхом АЗКЦ і КЗЦ *in vitro*.

"Антитілозалежна клітинна цитотоксичність", або "антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність", або "АЗКЦ" є механізмом індукції загибелі клітин, який залежить від взаємодії покритих антитілами клітин-мішеней з ефекторними клітинами, які мають літичну активність, такими як природні клітини-кілери, моноцити, макрофаги й нейтрофіли, через Fc-гамма-рецептори (FcγR), що експресуються на ефекторних клітинах. Наприклад, NK-клітини експресують рецептор FcγRIIIa, тоді як моноцити експресують рецептори FcγRI, FcγRII і FcγRIIIa. Загибель покритої антитілами клітини-мішені, наприклад клітин, що експресують CD38, відбувається в результаті активності ефекторних клітин внаслідок секреції мембранних пороформуючих білків і протеаз. Для оцінки АЗКЦ-активності антитіла до CD38 *in vitro* антитіло можна додавати до клітин, що експресують CD38, у комбінації з імунними ефекторними клітинами, які можуть бути активовані комплексами антиген-антитіло, що призводить до цитолізу клітини-мішені. Зазвичай цитоліз виявляють за вивільненням із лізованих клітин мітки (наприклад, радіоактивних субстратів, флуоресцентних барвників або природних внутрішньоклітинних білків). Наприклад, для аналізу можна використовувати первинні МНKKM, взяті у хворих з В-клітинним злоякісним новоутворенням, таким як MM. В ілюстративному аналізі МНKKM можна обробляти протягом 1 години антитілом до CD38 у концентрації 0,3-10 мкг/мл, а виживаність первинних клітин CD138<sup>+</sup> MM можна визначати шляхом проточної цитометрії з використанням методик, описаних у публікації van der Veer et al., *Haematologica* 96:284-290, 2001 або в публікації van der Veer et al., *Blood Cancer J* 1(10):e41, 2011. Відсоток лізису клітин MM можна визначати відносно ізотипного контролю, як описано в цьому документі. Антитіла до CD38, які використовуються в способах винаходу, можуть індукувати АЗКЦ за приблизно 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 100 % порівняно з контролем.

"Комплементзалежна цитотоксичність" або "КЗЦ" відноситься до механізму індукції загибелі клітин, у якому Fc-ефекторний домен антитіла, зв'язаного з мішенню, зв'язується з компонентом C1q комплементу й активує його, що, у свою чергу, активує каскад комплементу, призводячи до загибелі клітини-мішені. Активація комплементу може також призвести до відкладення компонентів комплементу на поверхні клітини-мішені, що полегшує АЗКЦ шляхом зв'язування рецепторів комплементу (наприклад, CR3) на лейкоцитах. В ілюстративному аналізі первинні МНKKM, взяті у хворих з В-клітинним злоякісним новоутворенням, можна обробляти протягом 1 години антитілом до CD38 і комплементом, отриманим з 10 % змішаної людської сироватки, у концентрації 0,3-10 мкг/мл, а виживаність первинних клітин CD138<sup>+</sup> MM можна визначати шляхом проточної цитометрії з використанням методик, описаних у публікації van der Veer et al., *Haematologica* 96:284-290, 2011; van der Veer et al., *Blood Cancer J* 1(10):e41, 2011. Відсоток

лізису клітин MM можна визначати відносно ізотипного контролю, як описано в цьому документі. Антитіла до CD38, які використовуються в способах винаходу, можуть індукувати КЗЦ на приблизно 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 100 %.

Здатність моноклональних антитіл індукувати АЗКЦ може бути підвищена шляхом конструювання їхнього олігосахаридного компонента. IgG1 або IgG3 людини є N-глікозилізованими на Asn297 із більшістю гліканів у добре відомих біантенарних формах G0, G0F, G1, G1F, G2 або G2F. Антитіла, отримані за допомогою несконструйованих клітин CHO, як правило, мають вміст фукози гліканів приблизно принаймні 85 %. Видалення корової фукози з олігосахаридів типу біантенарних комплексів, приєднаних до Fc-областей, підвищує АЗКЦ антитіл через покращення зв'язування FcγRIIIa без впливу на зв'язування антигена або активність КЗЦ. Такі антитіла можна отримати з використанням різних способів, описаних як такі, що призводять до експресії антитіл із відносно високим рівнем дефукозилування, які несуть Fc-олігосахариди типу біантенарного комплексу, наприклад контролю осмоляльності культури (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), застосування варіанта Lec13 клітинної лінії CHO як клітинної лінії-хазяїна (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-40, 2002), застосування варіанта EB66 клітинної лінії CHO як клітинної лінії-хазяїна (Olivier et al., *MAbs* 2(4), 2010; електронна публікація до виходу з друку; PMID:20562582), застосування щурячої гібридомної клітинної лінії YB2/0 як клітинної лінії-хазяїна (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введення малих інтерферуючих РНК, зокрема проти гена 1,6-фукозилтрансферази (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004) або коекспресії β-1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III і α-манозидази II комплексу Гольджи або ефективного інгібітора альфа-манозидази I кіфунезину (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008). АЗКЦ, викликану антитілами до CD38, які використовуються в способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення, можна посилювати шляхом певних заміщень у Fc-фрагментах антитіл. Прикладами заміщень є, наприклад, заміщення в позиціях амінокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 або 430 (нумерація залишків згідно з індексом EU), як описано в патенті США № 6,737,056. КЗЦ, викликану антитілами до CD38, які використовуються в способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення, можна посилювати шляхом певних заміщень у Fc-фрагментах антитіл. Прикладами заміщень є, наприклад, заміщення в позиціях амінокислот 423, 268, 267 і/або 113 (нумерація залишків згідно з індексом EU), як описано в публікації Moore et al., *Mabs* 2:181-189, 2010.

У деяких описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 містять заміщення у Fc-фрагментах антитіл.

У деяких описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 містять заміщення у Fc-фрагментах антитіл у позиціях амінокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 і/або 430 (нумерація залишків згідно з індексом EU).

У деяких описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 містять заміщення у Fc-фрагментах антитіл у позиціях амінокислот 113, 267, 268 і/або 423 (нумерація залишків згідно з індексом EU).

Іншим варіантом втілення винаходу, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 конкурує за зв'язування з CD38 з антитілом, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

Іншим варіантом втілення винаходу, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де антитіло до CD38 конкурує за зв'язування з CD38 з антитілом, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5 (даратумумаб).

Антитіла можна оцінювати щодо їхньої конкуренції з даратумумабом, що має VH із SEQ ID NO: 4 і VL із SEQ ID NO: 5, за зв'язування з CD38 з використанням відомих способів *in vitro*. В ілюстративному способі клітини CHO, які рекомбінантно експресують CD38, можна інкубувати з неміченим даратумумабом протягом 15 хв за 4 °C із подальшою інкубацією з надлишком флуоресцентно-міченого досліджуваного антитіла протягом 45 хв за 4 °C. Після промивання у ФСБ/БСА флуоресценцію можна виміряти за допомогою проточної цитометрії з використанням стандартних способів. В іншому ілюстративному способі позаклітинну частину людського CD38 можна нанести як покриття на планшет для аналізу ELISA. Протягом приблизно 15 хвилин можна додавати надлишок неміченого даратумумабу, після чого можна додати біотинільовані досліджувані антитіла. Після промивання у ФСБ/твіні зв'язування досліджуваних біотинільованих антитіл можна виявити з використанням стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP), і провести детекцію сигналу з використанням стандартних способів. Цілковито очевидно, що в конкурентних аналізах даратумумаб може бути міченим, а досліджуване антитіло — неміченим. Досліджуване антитіло конкурує з даратумумабом, якщо даратумумаб інгібує зв'язування досліджуваного антитіла або досліджуване антитіло інгібує зв'язування даратумумабу на 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 100 %. Епітоп досліджуваного антитіла можна визначити додатково, наприклад, шляхом пептидного картування або аналізів захисту від обміну водню/дейтерію з використанням відомих способів.

Іншим варіантом втілення винаходу, розкритим у цьому документі, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38, яке зв'язується з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1) у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК).

Іншим варіантом втілення винаходу, розкритим у цьому документі, включеним у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38, яке зв'язується з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1) у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукуює знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ). Антитіло "зв'язується з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3)", коли антитіло зв'язує принаймні один амінокислотний залишок в межах кожної області. Антитіло може зв'язувати, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 амінокислотних залишків в межах області з SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3. Антитіло також може необов'язково зв'язувати один або більше залишків поза межами областей з SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3. Зв'язування можна оцінити за допомогою відомих способів, таких як дослідження мутагенезу, або шляхом визначення кристалічної структури CD38 в комплексі з антитілом. У деяких варіантах втілення, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, епітоп антитіла містить принаймні одну амінокислоту в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні одну амінокислоту в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах втілення, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, епітоп антитіла містить принаймні дві амінокислоти в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні дві амінокислоти в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах втілення, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, епітоп антитіла містить принаймні три амінокислоти в області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і принаймні три амінокислоти в області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах втілення, розкритих у цьому документі, включених у перераховані нижче пронумеровані варіанти втілення, антитіло до CD38 зв'язується з епітопом, який містить принаймні KRN у області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і містить принаймні VQLT (SEQ ID NO: 22) у області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1).

У деяких варіантах втілення винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 зв'язується з епітопом, який містить принаймні KRN у області SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і містить принаймні VQLT (SEQ ID NO: 22) у області EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1).

Прикладом антитіла, що зв'язується з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1) або мінімально із залишками KRN і VQLT (SEQ ID NO: 22), як показано вище, є даратумумаб, який має певні послідовності VH, VL і CDR, описані вище. Антитіла, що зв'язуються з областю SKRNIQFSCKNYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1) можуть бути отримані, наприклад, шляхом імунізації мишей пептидами, які мають амінокислотні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 2 і 3, з використанням стандартних способів і як описано в цьому документі. Антитіла можна додатково оцінювати, наприклад, шляхом аналізу конкуренції між даратумумабом і досліджуваним антитілом за зв'язування з CD38, як описано вище.

В описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 може зв'язуватися з CD38 людини з різними афінностями ( $K_D$ ). В одному варіанті втілення відповідно до винаходу і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 зв'язується з CD38 із високою афінністю, наприклад із  $K_D$ , що дорівнює або є меншою ніж приблизно  $10^{-7}$  M, наприклад приблизно  $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$  або  $9 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-11}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-12}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-13}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-14}$  M, приблизно  $1 \times 10^{-15}$  M або будь-який діапазон або значення в цьому діапазоні, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу або способом KInExA, який використовують фахівці в цій галузі. Один приклад афінності дорівнює або є меншим ніж  $1 \times 10^{-8}$  M. Інший приклад афінності дорівнює або є меншим ніж  $1 \times 10^{-9}$  M.

У деяких описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 має біантенарну гліканову структуру з умістом фукози від приблизно 0 % до приблизно 15 %, наприклад 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % або 0 %.

У деяких описаних у цьому документі способах і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 має біантенарну гліканову структуру з умістом фукози приблизно 50 %, 40 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % або 0 %.

Заміщення у Fc і зниження вмісту фукози можуть підвищувати активність АЗКЦ антитіла до CD38.

"Вміст фукози" стосується кількості моносахариду фукози в ланцюзі цукрів у Asn297. Відносна кількість фукози являє собою відсоток фукозовмісних структур, пов'язаних з усіма глікоструктурами. Глікоструктури можна охарактеризувати й визначити кількісно декількома способами, наприклад: 1) з використанням часопротіної матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI-TOF) зразків, оброблених N-глікозидазою F (наприклад, комплексних, гібридних і оліго- й високоманозних структур), як описано в міжнародній патентній публікації № WO2008/077546; 2) шляхом ферментативного вивільнення гліканів Asn297 із подальшою дериватизацією й виявленням/кількісним визначенням за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) або надпродуктивної рідинної хроматографії (НПРХ) з флуоресцентною детекцією й/або ВЕРХ-МС (НПРХ-МС); 3) аналізом інтактних білків нативних або ослаблених mAb з обробкою або без обробки гліканів Asn297 ферментом Endo S або іншим ферментом, що розщеплює зв'язок між першим і другим моносахаридами GlcNAc, залишаючи фукозу прикріпленою до першого GlcNAc; 4) розщепленням mAb на складові пептиди за допомогою ферментативного розщеплення (наприклад, трипсином або ендопептидазою Lys-C) і наступним розділенням, виявленням і кількісним визначенням за допомогою ВЕРХ-МС (НПРХ-МС); або 5) відділенням олігосахаридів mAb від білка mAb за допомогою специфічного ферментативного деглікозилювання з використанням PNGase F на Asn 297. Олігосахариди, вивільнені в такий спосіб, можуть бути мічені флуорофором, розділені й ідентифіковані з використанням різних взаємодоповнюючих способів, які забезпечують: точну характеристику гліканових структур за допомогою матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI) мас-спектрометрії шляхом порівняння експериментальних мас з теоретичними масами, визначення ступеня сіалування шляхом іонообмінної ВЕРХ (GlycoSep C), розділення й кількісного визначення форм олігосахаридів згідно з критеріями гідрофільності за допомогою нормофазної ВЕРХ (GlycoSep N) і розділення й кількісного визначення олігосахаридів способом високоефективного капілярного електрофорезу з лазерно-індукованою флуоресценцією (HPCE-LIF).



У контексті цієї заявки "низький рівень фукози" або "низький вміст фукози" стосується антитіл з умістом фукози в діапазоні приблизно 0 %-15 %.

У контексті цього документа "нормальний рівень фукози" або "нормальний вміст фукози" стосується антитіл з умістом фукози приблизно вище 50 %, як правило, приблизно вище 60 %, 70 %, 80 % або вище 85 %.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить послідовності областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить послідовності областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) із SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить послідовності областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно й послідовності областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) із SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить важкий ланцюг із SEQ ID NO: 12 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 13.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 14 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 15.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 16 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 17.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 18 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 19.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 20 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 21.

У деяких способах винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 містить важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, що на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності з SEQ ID NO: 12, і легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, що на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності з SEQ ID NO: 13.

Антитіла, які по суті є ідентичними антитілу, що містить важкий ланцюг із SEQ ID NO: 12 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 13, можна використовувати в способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення.

У контексті цього документа термін "по суті ідентичні" означає, що дві амінокислотні послідовності важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла, які порівнюють, є однаковими або мають "несуттєві відмінності". Несуттєві відмінності — це заміщення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот у послідовності важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла, які не мають негативного впливу на властивості антитіла. Відсоток ідентичності можна визначити, наприклад, шляхом попарного вирівнювання з використанням налаштувань за замовчуванням модуля AlignX Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, м. Карлсбад, штат Каліфорнія, США). Послідовності білка згідно з цим винаходом можна використати як послідовність запиту для здійснення пошуку в публічно доступних або патентних базах даних, наприклад, для визначення споріднених послідовностей. Типовими програмами, які використовують для

здійснення таких пошуків, є програми XBLAST або BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) або комплект GenomeQuest™ (GenomeQuest, м. Уестборо, штат Массачусетс, США) з використанням налаштувань за замовчуванням. Приклади заміщень, які можуть бути виконані в антитілах до CD38, які використовуються в способах винаходу, являють собою, наприклад, консервативні заміщення амінокислотою, яка має аналогічний заряд, гідрофобні або стереохімічні характеристики. Для покращення властивостей антитіл, наприклад стабільності або афінності, або для покращення ефекторних функцій антитіл можуть також бути виконані консервативні заміщення. Можуть бути виконані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислотних заміщень, наприклад, у важкому або легкому ланцюзі антитіла до CD38. Крім того, будь-який нативний залишок у важкому або легкому ланцюзі може бути також заміщений аланіном, як було описано раніше для аланінскануючого мутагенезу (MacLennan et al., *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv Biophys* 35:1-24, 1998). Фахівці в цій галузі можуть визначити бажані заміщення амінокислот на момент, коли такі заміщення є бажаними. Амінокислотні заміщення можна провести, наприклад, за допомогою ПЛР-мутагенезу (патент США № 4,683,195). Бібліотеки різновидів можна отримувати з використанням добре відомих способів, наприклад з використанням випадкових (NNK) або не випадкових кодонів, наприклад DVK-кодонів, які кодуєть 11 амінокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), і скринінгу бібліотек на різновиди з бажаними властивостями. Отримані варіанти можуть бути протестовані на їхнє зв'язування з CD38, їхню здатність індукувати АЗКЦ, АЗКФ або апоптоз *in vitro* із використанням способів, описаних у цьому документі.

У деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 є біспецифічним антитілом. Області VL і/або VH існуючого антитіла до CD38 або області VL і VH, ідентифіковані *de novo*, як описано вище, можуть бути сконструйовані в біспецифічні повнорозмірні антитіла. Такі біспецифічні антитіла можна створити шляхом модуляції взаємодій CH3 між важкими ланцюгами двох моноспецифічних антитіл з отриманням біспецифічних антитіл із використанням методик, таких як ті, що описані в патенті США № 7,695,936; міжнародній патентній публікації № WO04/111233; публікації патенту США № US2010/0015133; публікації патенту США № US2007/0287170; міжнародній патентній публікації № WO2008/119353; публікації патенту США № US2009/0182127; публікації патенту США № US2010/0286374; публікації патенту США № US2011/0123532; міжнародній патентній публікації № WO2011/131746; міжнародній патентній публікації № WO2011/143545; або публікації патенту США № US2012/0149876. Додатковими біспецифічними структурами, у які можна вбудувати області VL і/або VH антитіл згідно з винаходом, є, наприклад, імуноглобуліни з подвійним варіабельним доменом (міжнародна патентна публікація № WO2009/134776) або структури, які включають різноманітні димеризаційні домени для поєднання двох плечей антитіла з відмінною специфічністю, такі як "лейцинова застібка" або колагенові димеризаційні домени (міжнародна патентна публікація № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441).

Іншим варіантом втілення цього винаходу є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноєвою кислотою (ПТРК), де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому (ММ), гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), неходжкінську лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВБКЛ), лімфому Беркітта (ЛБ), фолікулярну лімфому (ФЛ) або лімфому з клітин зони мантиї (ЛКМ).

Іншим варіантом втілення цього винаходу є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноєвою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому (ММ), гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), неходжкінську лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВБКЛ), лімфому Беркітта (ЛБ), фолікулярну лімфому (ФЛ) або лімфому з клітин зони мантиї (ЛКМ).

Іншим варіантом втілення цього винаходу є спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноєвою кислотою (ПТРК), де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому (ММ).

Іншим варіантом втілення винаходу є спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує,

антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому (ММ).

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування антитілом до CD38.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування антитілом до CD38.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, що має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, який має множинну мієлому, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, що має множинну мієлому, який включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом.

У деяких варіантах втілення винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом, де принаймні один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід, бортезоміб, мелфалан, дексаметазон або талідомід.

У деяких варіантах втілення винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом, де принаймні один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід, бортезоміб, мелфалан, дексаметазон, талідомід, циклофосфамід, гідроксидаунорубіцин (доксорубіцин), вінкристин або преднізон.

У деяких варіантах втілення винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом, де принаймні один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід і/або бортезоміб.

Для визначення того, чи є суб'єкт резистентним, чи розвинулась у нього резистентність, або чи є він схильним до розвитку резистентності до лікування антитілом до CD38 або іншим терапевтичним агентом, можна застосовувати різноманітні якісні й/або кількісні способи. Симптоми, які можуть бути пов'язані з резистентністю, включають, наприклад, погіршення або відсутність покращення стану здоров'я пацієнта, збільшення розміру пухлини, підвищення кількості ракових клітин, зупинення або сповільнення зниження росту пухлини або пухлинних клітин і/або розповсюдження ракових клітин у організмі з однієї локалізації в інші органи,

тканини або клітини. Повернення або погіршення різних симптомів, пов'язаних із пухлиною, також може бути ознакою того, що в суб'єкта розвинулася резистентність або він є схильним до розвитку резистентності до антитіла до CD38 або іншого терапевтичного агента. Симптоми, пов'язані з раком, можуть варіюватися залежно від типу раку. Наприклад, симптоми, пов'язані з В-клітинними злоякісними новоутвореннями, можуть включати збільшення лімфовузлів на шиї, у паху або в пахвах, гарячку, нічну пітливість, кашель, біль у грудях, безпричинну втрату маси тіла, здуття або біль у животі або почуття повноти. Ремісію злоякісних лімфом стандартизовано з використанням критеріїв Cheson (Cheson et al., J Clin Oncology 25:579-586, 2007), чиї рекомендації можна використовувати для визначення того, чи розвинулась у суб'єкта резистентність до антитіла до CD38 або іншого терапевтичного агента.

У деяких варіантах втілення винаходу, описаних у цьому документі, і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення суб'єкт, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, є гомозиготним за фенілаланіном у позиції 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/F) або гетерозиготним за валіном і фенілаланіном у позиції 158 CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/V). CD16 також відомий як рецептор Fc гамма IIIa (FcγRIIIa) або ізоформа III-A рецептора Fc-області низькоафінного імунглобуліну гамма. Було продемонстровано, що поліморфізм валіну/фенілаланіну (V/F) у позиції залишку 158 білка FcγRIIIa впливає на афінність FcγRIIIa до IgG людини. Рецептор з поліморфізмом FcγRIIIa-158F/F або FcγRIIIa-158F/V демонструє знижене залучення Fc і, таким чином, знижену АЗКЦ порівняно з FcγRIIIa-158V/V. Відсутність або низька кількість фукози в людських N-зв'язаних олігосахаридах покращує здатність антитіл індукувати АЗКЦ за рахунок покращеного зв'язування антитіл з людським FcγRIIIa (CD16) (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-40, 2002). Пацієнтам можна виконати аналіз на поліморфізм FcγRIIIa з використанням звичайних способів.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де суб'єкт є гомозиготним за фенілаланіном у позиції 158 CD16 або гетерозиготним за валіном і фенілаланіном у позиції 158 CD16.

У винаході також запропоновано спосіб лікування суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК), де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), де суб'єкт є гомозиготним за фенілаланіном у позиції 158 CD16 або гетерозиготним за валіном і фенілаланіном у позиції 158 CD16.

Введення/фармацевтичні композиції

У способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 можуть бути забезпечені у відповідних фармацевтичних композиціях, які містять антитіло до CD38 і фармацевтично прийнятний носій. Носій може являти собою розріджувач, ад'ювант, наповнювач або носій, з яким уводять антитіло до CD38. Такі носії можуть бути рідинами, такими як вода й олії, у тому числі олії з нафти, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія тощо. Наприклад, можна використовувати 0,4 % фізіологічний розчин і 0,3 % гліцин. Ці розчини повинні бути стерильними й не містити жодних твердих частинок. Їх можна стерилізувати за допомогою загальноприйнятих, добре відомих способів стерилізації (наприклад, фільтрації). Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як агенти, що коригують рН, і буферні агенти, стабілізуючі агенти, загущувачі, ковзні агенти й барвники тощо. Концентрація молекул або антитіл згідно з цим винаходом у такій фармацевтичній композиції може змінюватися в широких межах, тобто від менш ніж приблизно 0,5 %, звичайно до принаймні приблизно 1 %, до 15 або 20 % за масою, і буде вибрана в першу чергу виходячи з необхідної дози, об'ємів рідини, в'язкості тощо залежно від вибраного конкретного способу введення. Відповідні носії й композиції включно з іншими білками людини, наприклад сироватковим альбуміном людини, описані, наприклад, у публікації Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, див. особливо pp. 958-989.

Спосіб введення антитіла до CD38 у способах винаходу може бути будь-яким відповідним способом, таким як парентеральне введення, наприклад внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне або підшкірне, легеневе, через слизові оболонки

(пероральне, інтраназальне, інтравагінальне, ректальне), або іншими засобами, визнаними фахівцями й добре відомими в цій галузі.

Антитіло до CD38 у способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення можна вводити пацієнтові будь-яким відповідним способом, наприклад парентерально шляхом внутрішньовенної (в/в) інфузії або болюсної ін'єкції, внутрішньом'язово, або підшкірно, або внутрішньоочеревинно. Внутрішньовенну (в/в) інфузію можна, наприклад, вводити протягом 15, 30, 60, 90, 120, 180 або 240 хвилин або впродовж 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 годин.

Доза, яку вводять пацієнтові з CD38-позитивним злоякісним гематологічним новоутворенням, є достатньою, щоб полегшити або принаймні частково зупинити захворювання, що підлягає лікуванню ("терапевтично ефективна кількість"), і може іноді становити від 0,005 мг/кг до приблизно 100 мг/кг, наприклад від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 30 мг/кг або від приблизно 5 мг до приблизно 25 мг/кг, або приблизно 4 мг/кг, приблизно 8 мг/кг, приблизно 16 мг/кг або приблизно 24 мг/кг, або, наприклад, приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мг/кг, але може бути навіть вищою, наприклад, приблизно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мг/кг.

Можна також вводити фіксовану одиничну дозу, наприклад 50, 100, 200, 500 або 1000 мг, або доза може ґрунтуватися на площі поверхні тіла пацієнта, наприклад 500, 400, 300, 250, 200 або 100 мг/м<sup>2</sup>. Зазвичай для лікування CD38-позитивного В-клітинного злоякісного новоутворення можна вводити від 1 до 8 доз (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8), але можна вводити 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше доз.

Введення антитіла до CD38 у способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення можна повторювати через один день, два дні, три дні, чотири дні, п'ять днів, шість днів, один тиждень, два тижні, три тижні, один місяць, п'ять тижнів, шість тижнів, сім тижнів, два місяці, три місяці, чотири місяці, п'ять місяців, шість місяців або довше. Повторні курси лікування також можливі як довготривале введення. Повторне введення може бути в тій самій дозі або в іншій дозі. Наприклад, антитіло до CD38 у способах винаходу можна вводити в дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг з інтервалом один тиждень протягом 8 тижнів з наступним введенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні два тижні протягом додаткових 16 тижнів з наступним введенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні чотири тижні шляхом внутрішньовенної інфузії.

У способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 можна вводити як підтримуючу терапію, наприклад, один раз на тиждень протягом періоду 6 місяців або більше.

Наприклад, антитіла до CD38 у способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення можуть бути забезпечені у вигляді добової дози в кількості приблизно 0,1-100 мг/кг, наприклад 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мг/кг на добу принаймні в один із днів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 або, альтернативно, принаймні в один із тижнів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 після початку лікування (або в будь-якій комбінації перерахованого) із використанням однократних або розділених доз кожні 24, 12, 8, 6, 4 або 2 години (або будь-якої комбінації перерахованого).

У способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіла до CD38 також можна вводити профілактично з метою зниження ризику розвитку раку, затримки початку наступного виникнення події прогресування раку й/або зменшення ризику рецидиву на стадії ремісії раку. Це може бути особливо корисним у пацієнтів, у яких важко визначити місце знаходження пухлини, присутність якої відома відповідно до інших біологічних факторів.

У способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення антитіло до CD38 можна ліофілізувати для зберігання, а безпосередньо перед використанням розводити у відповідному носії. Доведено, що ця методика є ефективною при використанні звичайних білкових препаратів, і можна використовувати добре відомі методики ліофілізації й відновлення.

Антитіло до CD38 у способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення можна вводити в комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК).

ПТРК може бути запропонована в дозі 45 мг/м<sup>2</sup> на добу перорально або 25 мг/м<sup>2</sup> на добу перорально.

Антитіло до CD38 у способах винаходу й у деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення можна вводити в комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК) і третім терапевтичним агентом.

У способах за цим винаходом і в деяких варіантах втілення з усіх без винятку перерахованих нижче пронумерованих варіантів втілення третім терапевтичним агентом може бути мелфалан, мехлоретамін, тіоепа, хлорамбуцил, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфан, дибромоманніт, стрептозоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, мітоміцин С, цисплатин і інші похідні платини, такі як карбоплатин, талідомід або аналог талідоміду, леналідомід або CC4047, протеасомний інгібітор, такий як бортезоміб, або алкалоїд барвінку, такий як вінкристин, або антрациклін, такий як доксорубіцин.

Хоча винахід описано в загальних рисах, варіанти втілення винаходу будуть додатково описані в наведених нижче прикладах, які не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг формули винаходу.

Додаткові варіанти втілення винаходу

Нижче наведені деякі додаткові варіанти втілення винаходу відповідно до розкриття, наведеного в іншому місці цього опису. Наведені вище особливості варіантів втілення винаходу, які описані як такі, що відносяться до винаходу, розкритого в цьому документі, також відносяться до всіх без винятку цих додаткових пронумерованих варіантів втілення.

1. Антитіло до CD38 для застосування в лікуванні суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, у комбінації з повністю транс-ретиноевою кислотою (ПТРК).

2. ПТРК для застосування в лікуванні суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення, у комбінації з антитілом до CD38.

3. Комбінація антитіла до CD38 і ПТРК для застосування в лікуванні суб'єкта, який має CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення.

4. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіанта втілення 1, ПТРК для застосування відповідно до варіанта втілення 2 або комбінація для застосування відповідно до варіанта втілення 3, де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, шляхом

- a. антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ);
- b. комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ); або
- c. як АЗКЦ, так і КЗЦ, in vitro.

5. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіанта втілення 1, ПТРК для застосування відповідно до варіанта втілення 2 або комбінація для застосування відповідно до варіанта втілення 3, де антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, in vitro шляхом АЗКЦ.

6. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіанта втілення 1, 4 або 5, ПТРК для застосування відповідно до варіанта втілення 2, 4 або 5 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-5, де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою множинну мієлому (ММ), гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), неходжкінську лімфому (НХЛ), дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВВКЛ), лімфому Беркітта (ЛБ), фолікулярну лімфому (ФЛ) або лімфому з клітин зони мантиї (ЛКМ).

7. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіантів втілення 1, 4-6, ПТРК для застосування відповідно до варіантів втілення 2, 4-6 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-6, де CD38-позитивне злоякісне гематологічне новоутворення являє собою ММ.

8. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіантів втілення 1, 4-7, ПТРК для застосування відповідно до варіантів втілення 2, 4-7 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-7, де суб'єкт має резистентність або набув резистентності до лікування принаймні одним хіміотерапевтичним агентом і антитілом до CD38 або комбінацією принаймні одного хіміотерапевтичного агента й антитіла до CD38.

9. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіантів втілення 1, 4-8, ПТРК для застосування відповідно до варіантів втілення 2, 4-8 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-8, де принаймні один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід, бортезоміб, мелфалан, дексаметазон або талідомід.

10. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіантів втілення 1, 4-9, ПТРК для застосування відповідно до варіантів втілення 2, 4-9 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-9, де принаймні один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід або бортезоміб.

11. Антитіло до CD38 для застосування відповідно до варіантів втілення 1, 4-10, ПТРК для застосування відповідно до варіантів втілення 2, 4-10 або комбінація для застосування відповідно до варіантів втілення 3-10, де

а. антитіло до CD38 має ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4;

б. антитіло до CD38 конкурує за зв'язування з CD38 з антитілом, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5;

с. антитіло до CD38 зв'язується з областю SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) і областю EKVQTLAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) людського CD38 (SEQ ID NO: 1);

д. антитіло до CD38 містить послідовності областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) із SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно;

е. антитіло до CD38 містить послідовності областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) із SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно;

ф. антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5;

г. антитіло до CD38 містить важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, що на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності з SEQ ID NO: 12, і легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, що на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності з SEQ ID NO: 13;

h. антитіло до CD38 містить важкий ланцюг із SEQ ID NO: 12 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 13;

i. антитіло до CD38 містить VH із SEQ ID NO: 14 і VL із SEQ ID NO: 15;

j. антитіло до CD38 містить VH із SEQ ID NO: 16 і VL із SEQ ID NO: 17;

k. антитіло до CD38 містить VH із SEQ ID NO: 18 і VL із SEQ ID NO: 19; або

l. антитіло до CD38 містить VH із SEQ ID NO: 20 і VL із SEQ ID NO: 21.

m.

Приклад 1. Загальні способи

Антитіла й реагенти

Людське моноклональне антитіло (mAb) до нешкідливого антигена (HIV-1 gp120) використовували як ізотипний контроль, як описано раніше (van der Veers et al., Haematologica 96:284-290, 2011; van der Veers et al., Blood Cancer J 1:e41, 2011). Повністю транс-ретіноєву кислоту (ПТРК) купували в компанії Sigma-Aldrich і розводили в диметилсульфоксиді (ДМСО).

Аналізи АЗКЦ на основі біolumінесцентної візуалізації (BLI) з використанням трансдукованих люциферазою (LUC) клітинних ліній MM

LUC-трансдуковані клітинні лінії MM культивували спільно з ефекторними клітинами (свіжовиділеними МНПК від здорових донорів) у співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней 1: 25 у білих непрозорих 96-ямкових планшетах із плоским дном (Costar) у присутності даратумумабу (0,001; 0,01; 0,1 і 1,0 мкг/мл) протягом чотирьох годин. Вживаність LUC<sup>+</sup>-клітин MM визначали шляхом BLI через 10 хвилин після додавання субстрату люциферину (125 мкг/мл; Promega). Лізис клітин MM визначали за такою формулою: % лізису = 1 - (середній сигнал BLI у присутності ефекторних клітин і даратумумабу / середній сигнал BLI у присутності ефекторних клітин і контрольного антитіла) × 100 %.

Аналізи КЗЦ на основі BLI з використанням LUC-трансдукованих клітинних ліній MM

Даратумумаб (0; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 і 3,0 мкг/мл) додавали до клітинних ліній MM у середовищі, доповненому змішаною людською сироваткою (10 %; Sanquin) або термічно інактивованою людською сироваткою. Після інкубування протягом 1 години за 37 °C визначали лізис клітин за допомогою BLI через 10 хвилин після додавання люциферину (125 мкг/мл) і обчислювали за такою формулою: % лізису = 1 - (середній сигнал BLI у присутності нативної людської сироватки / середній сигнал BLI у присутності термічно інактивованої сироватки) × 100 %.

Аналізи АЗКЦ і КЗЦ ex vivo на основі проточної цитометрії в МНKKM

Свіжовиділені МНKKM, які містять 2-57 % зловласних плазматичних клітин, як визначено за результатами проточної цитометрії, негайно використовували в експериментах ex vivo. Для експериментів з АЗКЦ МНKKM, які містять зловласні плазматичні клітини, а також власні ефекторні клітини хворого інкубували в середовищі RPMI+10 % фетальної бичачої сироватки з даратумумабом (0,01-10 мкг/мл) у 96-ямкових планшетах із плоским дном у повністю зволожених інкубаторах за 37 °C у суміші 5 % CO<sub>2</sub> з повітрям протягом 48 год. Життєздатність зразка під час інкубування становила більш ніж 98 %, як визначено з використанням барвника ToPro-3 (Invitrogen/молекулярні зонди). Для аналізів КЗЦ МНKKM обробляли даратумумабом (0,3-10 мкг/мл) і комплементом протягом 1 години перед проточною цитометрією. Змішану

людську сироватку (10 %) використовували як джерело комплементу. Виживаність первинних клітин CD138<sup>+</sup> MM у МНКМ визначали шляхом проточної цитометрії, як описано раніше (van der Veers et al., Haematologica 96:284-290, 2011; van der Veers et al., Blood Cancer J 1:e41, 2011). Клітини MM, що вижили, рахували шляхом одноплатформенної проточної цитометрії клітин CD138<sup>+</sup> (з використанням антитіла CD138-PE (Beckman Coulter, м. Майамі, штат Флорида, США)) у присутності флуоросфер Flow-Count (Beckman Coulter) для визначення абсолютної кількості клітин. Відсоток лізису клітин MM за різних умов обробки визначали відносно виживаності клітин MM у ямках планшета, оброблених контрольним антитілом (IgG1-b12 як контрольне антитіло IgG1 для даратумумабу) за такою формулою: % лізованих клітин = 1 - (абсолютна кількість клітин CD138<sup>+</sup>, що вижили, у оброблених ямках планшета / абсолютна кількість клітин CD138<sup>+</sup>, що вижили, у контрольних ямках) × 100 %.

Імунофенотипування шляхом проточної цитометрії

Експресію декількох білків клітинної поверхні визначали шляхом проточної цитометрії з використанням FITC-, PE-, Per-CP- або APC-кон'югованих моноклональних антитіл. Антитіла до CD38, антитіла до CD138 і антитіла до CD56 купували в компанії Beckman Coulter; антитіла до CD3, антитіла до CD16, антитіла до CD55, антитіла до CD59 — у компанії BD Biosciences; і антитіла до CD46 — у компанії Biolegend. Проточну цитометрію виконували з використанням пристрою FACS-Calibur (Becton Dickinson); дані аналізували з використанням програмного забезпечення CellQuest.

Статистика

Статистичні аналізи виконували з використанням програмного забезпечення Prism (Graphpad Software Inc, версія 5). Порівняння змінних виконували з використанням двостороннього t-критерію Стюдента для залежних вибірок. Кореляцію між змінними встановлювали з використанням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена. Значимими вважали р-значення нижчі за 0,05.

Приклад 2. ПТРК підвищує експресію CD38 на клітинних лініях MM і первинних клітинах MM

Підвищення рівнів експресії CD38 може посилювати ефективність даратумумабу в знищенні клітин MM через АЗКЦ і КЗЦ. Взаємодія ПТРК з ядерними рецепторами ретиноевої кислоти призводить до зміни експресії генів-мішеней, у тому числі до індукції експресії CD38 (Malavasi F. J Leukoc Biol 90:217-219, 2011; Drach et al., Cancer Res 54:1746-1752, 1994). Отже, досліджувався вплив ПТРК на клітинні лінії MM RPMI8226, UM9 і XG1. Клітини MM інкубували в середовищі RPMI-1640 окремо або разом із ПТРК у концентрації 0-25 нМ протягом 48 годин (Фіг. 1А) або інкубували разом із 10 нМ ПТРК протягом 24, 48, 72 або 96 годин (Фіг. 1В), а потім збирали для визначення експресії CD38 шляхом проточної цитометрії з використанням пристрою FACS-Calibur (Becton Dickinson) і антитіла до CD38 (Beckman Coulter). Дані аналізували з використанням програмного забезпечення CellQuest.

Мінімальна концентрація 10 нМ ПТРК була достатньою для індукування 1,9-4,4-кратного підвищення експресії CD38 на клітинних лініях MM RPMI8226, UM9 і XG1. Вищі дози ПТРК не посилювали додатково експресію CD38 (Фіг. 1А). Максимальне посилення експресії CD38 відбувалося через 48 годин (Фіг. 1В). Отже, у всіх подальших експериментах використовували 10 нМ ПТРК протягом 48 годин.

Також досліджували вплив ПТРК (10 нМ, 48 годин) на первинні клітини MM, взяті у 26 пацієнтів, за обробки ex vivo. У цих експериментах МНКМ від 26 пацієнтів на MM інкубували в середовищі RPMI-1640 окремо або спільно з 10 нМ ПТРК протягом 48 годин, інкубували за 4 °C протягом 20 хв спільно з FITC-кон'югованим антитілом до CD38 (Beckman Coulter), а потім збирали для визначення експресії CD38 шляхом проточної цитометрії. Проточну цитометрію аналізували з використанням пристрою FACS-Calibur (Becton Dickinson); дані аналізували з використанням програмного забезпечення CellQuest.

Індукована ПТРК експресія CD38 (медіана підвищення: 1,7-кратна, діапазон: 1,0-26,5-кратний) (Фіг. 2). Також спостерігалася значна стимуляція експресії CD138 (медіана підвищення: 2,0 кратна), що характерно для диференціації клітин MM. Навпаки, значних змін у експресії інших антигенів плазматичних клітин, таких як антигени HLA A/B/C або CD56, у відповідь на ПТРК не спостерігалася.

Приклад 3. Опосередкована ПТРК стимуляція експресії CD38 посилює опосередковану даратумумабом АЗКЦ і КЗЦ проти клітин MM

Можливий вплив ПТРК-індукованої стимуляції експресії CD38 на індуковану даратумумабом АЗКЦ і КЗЦ досліджували на клітинних лініях MM XG-1, RPMI8226 і UM9 і на первинних клітинах MM.

Стосовно клітинних ліній MM КЗЦ і АЗКЦ оцінювали з використанням аналізів АЗКЦ і КЗЦ на основі біоломінесцентної візуалізації (BLI), як описано вище. Стосовно первинних клітин MM



КЗЦ і АЗКЦ оцінювали з використанням аналізів АЗКЦ і КЗЦ на основі проточної цитометрії *ex vivo* у МНKKM, як описано вище. У цих аналізах клітини попередньо обробляли 10 нМ ПТРК або контрольним розчинником протягом 48 годин, після цього інкубували з використанням або без використання даратумумабу в присутності МНKKП як ефекторних клітин для оцінки АЗКЦ або в присутності людської сироватки як джерела комплементу для оцінки КЗЦ. Ізотипний контроль додавали в концентрації 10 мкг/мл, а 10 % термічно інактивованої сироватки використовували як контроль для КЗЦ.

На Фіг. 3А, Фіг. 3В й Фіг. 3С показані результати індукованої даратумумабом КЗЦ і АЗКЦ у клітинних лініях ХG1, RPMI8226 і UM9 відповідно.

Використання тільки 10 нМ ПТРК не індукувало лізис клітин MM. Попередня обробка клітинних ліній MM за допомогою 10 нМ ПТРК істотно підвищувала опосередковану даратумумабом КЗЦ у клітинах ХG-1 (Фіг. 3А) і АЗКЦ у клітинах ХG-1 (Фіг. 3А) і UM9 (Фіг. 3С) порівняно з контрольним розчинником (Фіг. 3А). У клітинах RPMI8226 не відзначалося істотного посилення опосередкованої даратумумабом АЗКЦ і КЗЦ. Такі відмінності в чутливості ПТРК можна частково пояснити тим фактом, що ПТРК посилювала експресію CD38 2,9-кратно в клітинах ХG-1 і 4,4-кратно в клітинах UM9, у той час як у клітинах RPMI8226 експресія підвищувалася лише 1,9-кратно (Фіг. 1А й 1В).

Приклад 4. Опосередкована ПТРК стимуляція експресії CD38 посилює опосередковану даратумумабом АЗКЦ і КЗЦ проти первинних клітин MM

Первинні клітини MM оцінювали для подальшого дослідження впливу опосередкованої ПТРК індукції експресії CD38 на чутливість даратумумабу.

На Фіг. 4А і Фіг. 4В показані результати індукованої даратумумабом КЗЦ і АЗКЦ відповідно в первинних клітинах MM, попередньо оброблених протягом 48 годин з використанням або без використання 10 нМ ПТРК. На графіках з Фіг. 4А і Фіг. 4В представлені об'єднані результати для зразків від 16 або 13 пацієнтів відповідно.

Попередня обробка первинних клітин MM за допомогою ПТРК протягом 48 годин призвела до істотного підвищення їхньої чутливості до опосередкованої даратумумабом КЗЦ у 13 з 16 пацієнтів (дані не показані) і до опосередкованої даратумумабом АЗКЦ у 8 з 11 пацієнтів (дані не показані). Об'єднані результати для цих пацієнтів показали, що ПТРК підвищила медіану КЗЦ, опосередкованої 10 мкг/мл даратумумабу, з 16,1 % до 43,9 % ( $P < 0,0001$ ) (Фіг. 4А) і підвищила медіану АЗКЦ, опосередкованої 10 мкг/мл даратумумабу, з 25,1 % до 39,5 % ( $P=0,0315$ ) (Фіг. 4В).

На Фіг. 5 показані результати індукованої даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від кожного пацієнта. На Фіг. 5А показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 1 і пацієнта 2. На Фіг. 5В показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 3 і пацієнта 4. На Фіг. 5С показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 5 і пацієнта 6. На Фіг. 5D показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 7 і пацієнта 8. На Фіг. 5Е показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 9 і пацієнта 10. На Фіг. 5F показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 11 і пацієнта 12. На Фіг. 5G показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 13 і пацієнта 14. На Фіг. 5H показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 15 і пацієнта 16. ПТРК індукувала опосередковану даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM, які не реагували на лише даратумумаб *in vitro* (наприклад, у випадку пацієнтів 1, 4, 8, 12, 13, 15 і 16). Ці первинні клітини MM брали в пацієнтів із рефрактерністю або подвійною рефрактерністю, як зазначено в таблиці 1. У зразках первинних клітин MM від деяких пацієнтів ПТРК не показала додаткового підвищення опосередкованої даратумумабом КЗЦ (наприклад, у пацієнтів 6, 7 і 14).

На Фіг. 6 показані результати індукованої даратумумабом АЗКЦ у первинних клітинах MM від кожного пацієнта. На Фіг. 6А показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 3 і пацієнта 4. На Фіг. 6В показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 7 і пацієнта 8. На Фіг. 6С показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 9 і пацієнта 10. На Фіг. 6D показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 14 і пацієнта 15. На Фіг. 6Е показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 16 і пацієнта 17. На Фіг. 6F показана індукована даратумумабом КЗЦ у первинних клітинах MM від пацієнта 18. ПТРК індукувала опосередковану даратумумабом АЗКЦ у більшості досліджуваних первинних клітин MM. Ці первинні клітини MM брали в пацієнтів із рефрактерністю або подвійною рефрактерністю, як зазначено в таблиці 1.

Також оцінювали поверхневу експресію CD38 у всіх цих досліджуваних первинних клітинах ММ у МНKKM, інкубованих у середовищі RPMI-1640 окремо або спільно з 10 нМ ПТРК протягом 48 годин (Фіг. 7).

Загальні результати свідчать про те, що використання ПТРК є привабливою стратегією для підвищення експресії CD38 і активності даратумумабу в клітинних лініях ММ і первинних клітинах ММ, включаючи клітини ММ, що є рефрактерними до опосередкованої даратумумабом КЗЦ і/або АЗКЦ.

У таблиці 1 показані вихідні характеристики МНKKM від 19 досліджуваних хворих на ММ. У таблиці \* рефрактерне захворювання до леналідоміду й/або бортезомібу визначається як прогресування захворювання під час лікування леналідомідом і бортезомібом, відсутність відповіді (менш ніж часткова відповідь) на лікування леналідомідом і бортезомібом або прогресування захворювання раніше ніж через 60 діб після припинення лікування за схемою, що включає використання леналідоміду й бортезомібу, відповідно до Єдиних міжнародних критеріїв оцінки відповіді на лікування для множинної мієломи.

Таблиця 1

	Пацієнт					
Параметр:	1	2	3	4	5	6
Вік (років)	71	43	71	64	64	55
Стать	Ч	Ч	Ж	Ч	Ч	Ж
Тип важкого ланцюга моноклонального антитіла	IgG	-	-	IgD	-	IgG
Тип легкого ланцюга	K	K	L	K	L	L
Попередня терапія						
Попередні лінії терапії (кількість)	10	4	4	6	3	0
Попередня трансплантація стовбурових клітин	так	так	так	так	так	ні
Аутологічна	так	так	так	так	так	ні
Алогенна	ні	ні	ні	ні	ні	ні
Попереднє лікування леналідомідом	так	так	так	так	так	ні
наявність рефрактерності* до леналідоміду	так	так	так	так	так	ні
Попереднє лікування бортезомібом	так	так	так	так	так	ні
наявність рефрактерності* до бортезомібу	так	так	так	так	так	ні
Експресія CD38 на клітинах ММ (СіФ)	1258	1346	764	1275	2642	1134
Експресія CD46 на клітинах ММ (СіФ)	1165	264	866	1346	661	1124
Експресія CD55 на клітинах ММ (СіФ)	610	119	552	227	1	594
Експресія CD59 на клітинах ММ (СіФ)	235	62	228	108	7	90
Пацієнт						
Параметр:	7	8	9	10	11	12
Вік (років)	55	64	75	63	56	59
Стать	Ж	Ч	Ч	Ж	Ч	Ч
Тип важкого ланцюга моноклонального антитіла	IgA	-	-	IgA	IgA	-
Тип легкого ланцюга	L	K	L	K	K	K
Попередня терапія						
Попередні лінії терапії (кількість)	2	2	5	6	2	4

Попередня трансплантація стовбурових клітин	так	так	ні	так	так	так
Аутологічна	так	так	ні	так	так	так
Алогенна	ні	ні	ні	ні	ні	ні
Попереднє лікування леналідомідом	ні	так	так	так	так	так
наявність рефрактерності* до леналідоміду	ні	так	так	так	ні	так
Попереднє лікування бортезомібом	так	так	так	так	ні	так
наявність рефрактерності* до бортезомібу	так	ні	так	так	ні	ні
Експресія CD38 на клітинах MM (СІФ)	1999	578	1252	1310	843	64
Експресія CD46 на клітинах MM (СІФ)	2288	4870	1700	196	368	264
Експресія CD55 на клітинах MM (СІФ)	655	528	813	4	362	60
Експресія CD59 на клітинах MM (СІФ)	92	151	241	7	74	47
Пацієнт						
Параметр:	13	14	15	16	17	18
Вік (років)	71	72	67	64	63	53
Стать	Ж	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Тип важкого ланцюга моноклонального антитіла	-	-	IgG	-	IgG	IgA
Тип легкого ланцюга	L	K	K	K	L	K
Попередня терапія						
Попередні лінії терапії (кількість)	4	5	2	3	4	2
Попередня трансплантація стовбурових клітин	так	ні	ні	так	так	так
Аутологічна	так	ні	ні	так	так	так
Алогенна	ні	ні	ні	ні	ні	ні
Попереднє лікування леналідомідом	так	так	так	так	ні	так
наявність рефрактерності* до леналідоміду	так	так	так	так	ні	так
Попереднє лікування бортезомібом	так	так	так	так	так	так
наявність рефрактерності* до бортезомібу	так	так	ні	так	ні	так
Експресія CD38 на клітинах MM (СІФ)	173	241	78	1000	667	11
Експресія CD46 на клітинах MM (СІФ)	300	492	362	491	538	557
Експресія CD55 на клітинах MM (СІФ)	379	1275	59	176	231	519
Експресія CD59 на клітинах MM (СІФ)	188	75	9	107	70	52

МНКМ — мононуклеарні клітини кісткового мозку. ММ — множинна мієлома. Ч — чоловік. Ж — жінка. К — каппа. L — лямбда.

- 5 Приклад 5. ПТРК пригнічує експресію CD55 і CD59 у первинних клітинах ММ
- Проведені експерименти показали, що попередня обробка клітин ММ за допомогою ПТРК зробила ці клітини більш чутливими до опосередкованої даратумумабом АЗКЦ і КЗЦ. Підвищення КЗЦ було більш вираженим, ніж підвищення АЗКЦ. Було досліджено підґрунтя для цього спостереження на молекулярному рівні.

Було оцінено вплив ПТРК на ефекторні клітини. ПТРК не впливала взагалі або чинила мінімальний вплив на здатність МНКПК від здорових донорів індукувати АЗКЦ на людських клітинних лініях MM L363-CD38, LME-1, RPMI8226 і UM9 (дані не показані). У протилежність цьому, ПТРК знижувала рівні експресії комплемент-інгібуючих білків CD55, CD59 і CD46 на клітинних лініях MM і первинних клітинах MM. У клітинах RPMI8226 (Фіг. 8А), L363 (Фіг. 8В) і XG-1 (Фіг. 8С) ПТРК знижувала рівні експресії CD55, CD59 і CD46. У первинних клітинах MM, отриманих від 16 пацієнтів, ПТРК істотно знижувала експресію CD55 (середнє зниження: 21,3 %;  $P=0,019$ ) (Фіг. 9А) і CD59 (середнє зниження: 37,5 %,  $P=0,0047$ ) (Фіг. 9В), але ПТРК не чинила значного впливу на рівні експресії CD46 (дані не показані). Рівні експресії CD46, CD55 і CD59 у досліджуваних зразках від 16 пацієнтів показані на Фіг. 10А (CD55), Фіг. 10В (CD59) і Фіг. 10С (CD46). В експериментах клітини культивували за 37 °С у середовищі RPMI-1640 з використанням або без використання 10 нМ ПТРК, 10 нМ протягом 48 год. Клітини інкубували за 4 °С протягом 20 хв разом із відповідною панеллю кон'югованих антитіл. Проточну цитометрію аналізували з використанням пристрою FACS-Calibur (Becton Dickinson); дані аналізували з використанням програмного забезпечення CellQuest.

Приклад 6. Ефективність *in vivo* комбінації ПТРК і даратумумабу проти росту пухлин MM у гуманізованому мікросередовищі

Гібридні каркаси, що складаються з трьох двофазних частинок із фосфату кальцію розміром 2-3 мм вкривали *in vitro* людськими мезенхімальними стромальними клітинами (МСК;  $2 \times 10^5$  клітин/каркас). Через тиждень культивування *in vitro* в остеогенному середовищі гуманізовані каркаси імплантували підшкірно мишам RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup>, як описано раніше (Groen et al., Blood. 19;120:e9-e16, 2012; de Haart et al., Clin.Cancer Res. 19:5591-5601, 2013).

Через вісім тижнів після імплантації миші отримували сублетальну дозу опромінення (3 Гр, 200 кВ, 4 мА) і трансдуковані люциферазою клітини XG1 були введені безпосередньо в каркас (1  $\times 10^6$  клітин/каркас). Через три тижні після інокуляції, коли ріст пухлини в каркасах можна було виявити шляхом біolumінесцентної візуалізації (BLI), різні групи мишей отримували лікування 1) носієм, 2) ПТРК плюс без-Т-клітинні МНКПК (МНКПК-Т) у якості ефекторних клітин, 3) даратумумабом плюс МНКПК-Т і 4) даратумумабом плюс ПТРК плюс МНКПК-Т. Даратумумаб (8 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно в дні 23, 30 і 37; МНКПК-Т ( $8 \times 10^6$  клітин/миша) вводили внутрішньовенно в дні 24, 31 і 38; і ПТРК (10 мг/кг) вводили шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції в дні 21-24, 28-31 і 35-38. МНКПК-Т отримували шляхом центрифугування лейкоцитарної плівки за градієнтом щільності в суміші Ficoll-Нугауе з подальшим усуненням Т-клітин за допомогою CD3-гранул з використанням технології EasySep™ (STEMCELL Technologies). За ростом пухлини спостерігали шляхом щотижневих вимірювань BLI, як описано раніше (Groen et al., Blood. 19;120:e9-e16, 2012). Усі експерименти на тваринах проводилися після отримання дозволу від місцевого комітету з етики на проведення експериментів на тваринах і відповідали Акту про експерименти на тваринах, прийнятому в Нідерландах. Статистичні відмінності між різними групами лікування в експериментах на мишах обчислювали з використанням критерію Манна-Уїтні. Значимими вважали *p*-значення нижчі за 0,05.

У мишей з імунodefіцитом RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> трансдуковані люциферазою клітини множинної мієломи XG1 розвинулися в агресивні пухлини в гуманізованому мікросередовищі кістковому мозку, утвореному в результаті підшкірної імплантації керамічних каркасів, укритих МСК. Для оптимального оцінювання впливів даратумумабу й ПТРК мишам сумісно вводили без-Т-клітинні МНКПК, збагачені NK-клітинами, від здорового донора в комбінації з даратумумабом і/або ПТРК, оскільки миші RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> позбавлені NK-клітин. Для відстежування росту пухлини щотижня виконували BLI протягом 5 тижнів. Як показано на Фіг. 11, даратумумаб суттєво сповільняв прогресування пухлини, у той час як ПТРК, за використання її як єдиного агента, не мала жодного впливу. У цій моделі ПТРК також істотно посилювала дію даратумумабу, спрямовану проти MM.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Lokhorst, Henk M.  
 Mutis, Tuna  
 Nijhof, Inger S.  
 Van de Donk, Niels

<120> Види комбінованої терапії з застосуванням антитіл до CD38

<130> JBI5051WOPCT

<140> Перевідступлення прав  
 <141> 2015-09-08

<150> 62/047,877  
 <151> 2014-09-09

<150> 62/087,287  
 <151> 2014-12-04

<160> 22

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys  
 1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val  
 20 25 30

# UA 122212 C2

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln  
 35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu  
 50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val  
 65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys  
 85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu  
 100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile  
 115 120 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr  
 130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys  
 145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp  
 165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val

# UA 122212 C2

	180		185		190
Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu
Ala	Ala	Cys	Asp	Val	Val
His	Val	Met	Leu		
195		200		205	
Asn	Gly	Ser	Arg	Ser	Lys
Ile	Phe	Asp	Lys	Asn	Ser
Thr	Phe	Gly	Ser		
210		215		220	
Val	Glu	Val	His	Asn	Leu
Gln	Pro	Glu	Lys	Val	Gln
Thr	Leu	Glu	Ala		
225		230		235	240
Trp	Val	Ile	His	Gly	Gly
Arg	Glu	Asp	Ser	Arg	Asp
Leu	Cys	Gln	Asp		
245		250		255	
Pro	Thr	Ile	Lys	Glu	Leu
Glu	Ser	Ile	Ile	Ser	Lys
Arg	Asn	Ile	Gln		
260		265		270	
Phe	Ser	Cys	Lys	Asn	Ile
Tyr	Arg	Pro	Asp	Lys	Phe
Leu	Gln	Cys	Val		
275		280		285	
Lys	Asn	Pro	Glu	Asp	Ser
Ser	Ser	Cys	Thr	Ser	Glu
Ile					
290		295		300	

<210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

# UA 122212 C2

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg  
1 5 10

<210> 3  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly  
1 5 10

<210> 4  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VH антитіла до CD38

<400> 4

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val



# UA 122212 C2

50

55

60

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

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

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 5  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VL антитіла до CD38

<400> 5

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

# UA 122212 C2

35

40

45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR1 антитіла до CD38

<400> 6

Ser Phe Ala Met Ser  
1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR2 антитіла до CD38

<400> 7

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR3 антитіла до CD38

<400> 8

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LCDR1 антитіла до CD38

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> LCDR2 антитіла до CD38

<400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> LCDR3 антитіла до CD38

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> важкий ланцюг антитіла до CD38

# UA 122212 C2

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

# UA 122212 C2

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285

# UA 122212 C2

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> легкий ланцюг антитіла до CD38

<400> 13

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
85 90 95



# UA 122212 C2

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH антитіла до CD38

<400> 14

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

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

Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> VL антитіла до CD38

<400> 15

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

# UA 122212 C2

<210> 16  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> VH антитіла до CD38

<400> 16

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp  
 100 105 110

# UA 122212 C2

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 17  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VL антитіла до CD38

<400> 17

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
85 90 95

# UA 122212 C2

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 18  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VH антитіла до CD38

<400> 18

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

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

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

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

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

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

# UA 122212 C2

Ala Arg Asp Leu Pro Leu Val Tyr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 19  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> VL антитіла до CD38

<400> 19

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val  
 20 25 30

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

Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

# UA 122212 C2

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105

<210> 20  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VH антитіла до CD38

<400> 20

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



# UA 122212 C2

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> 21  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> VL антитіла до CD38

<400> 21

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  
100 105

<210> 22  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

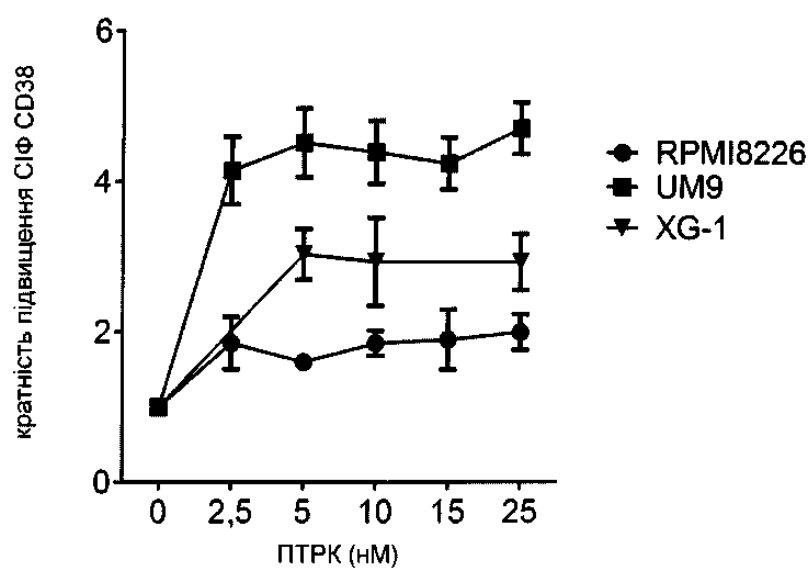
Val Gln Leu Thr  
1

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

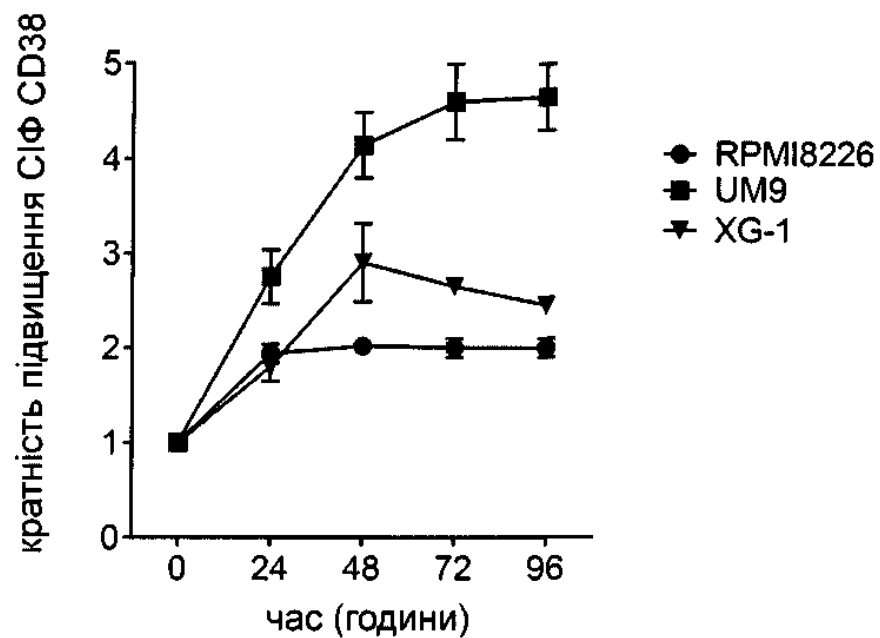
- 5 1. Спосіб лікування множинної мієломи (ММ) у суб'єкта, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, антитіла до CD38 у комбінації з повністю транс-ретіноєвою кислотою (ПТРК), де суб'єкт стійкий до або має набуту стійкість до лікування антитілом до CD38 або комбінації щонайменше одного хіміотерапевтичного агента і антитіла до CD38, і де антитіло до CD38:
  - а) містить послідовності, які визначають комплементарність областей важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) з SEQ ID NO: 6, 7 і 8 відповідно; і
  - 10 б) містить послідовності, які визначають комплементарність областей легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) з SEQ ID NO: 9, 10 і 11 відповідно.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 індукує знищення клітин, які експресують CD38, *in vitro* шляхом антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ).
- 15 3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, шляхом КЗЦ *in vitro*.
4. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 індукує знищення клітин, що експресують CD38, шляхом АЗКЦ *in vitro*.
- 20 5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що щонайменше один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід, бортезоміб, мелфалан, дексаметазон або талідомід.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що щонайменше один хіміотерапевтичний агент являє собою леналідомід або бортезоміб.
- 25 7. Спосіб за пп. 1, 2, 3 або 4, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 має ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 має ізотип IgG1.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 4 і варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 5.
- 30 10. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло до CD38 містить важкий ланцюг із SEQ ID NO: 12 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 13.
11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-10, в якому антитіло до CD38 і АТРА вводять:
  - а) разом у суміші;
  - 35 б) одночасно як окремі агенти; або

- с) послідовно як окремі агенти в будь-якому порядку.
12. Спосіб за п. 1, в якому введення суб'єкту антитіла до CD38 в комбінації з ATRA приводить до індукції залежної від комплементу цитотоксичності (CDC) антитіла до CD38.
13. Спосіб за п. 1, в якому введення суб'єкту антитіла до CD38 у комбінації з ATRA приводить до індукції антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (АКЗЦ) антитіла до CD38.
- 5 14. Спосіб за п. 1, в якому введення суб'єкту антитіла до CD38 в комбінації з ATRA приводить до уповільнення росту пухлини у суб'єкта.

Фиг. 1А.



Фіг. 1В.



Фіг. 2.

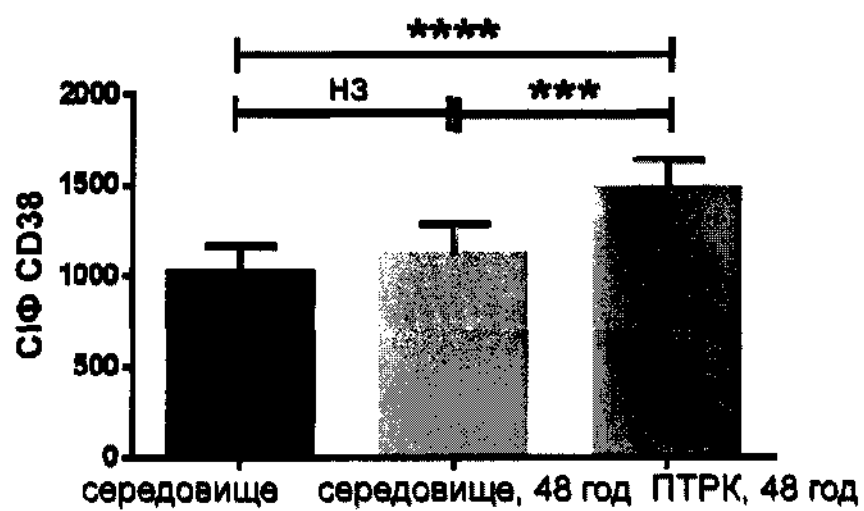
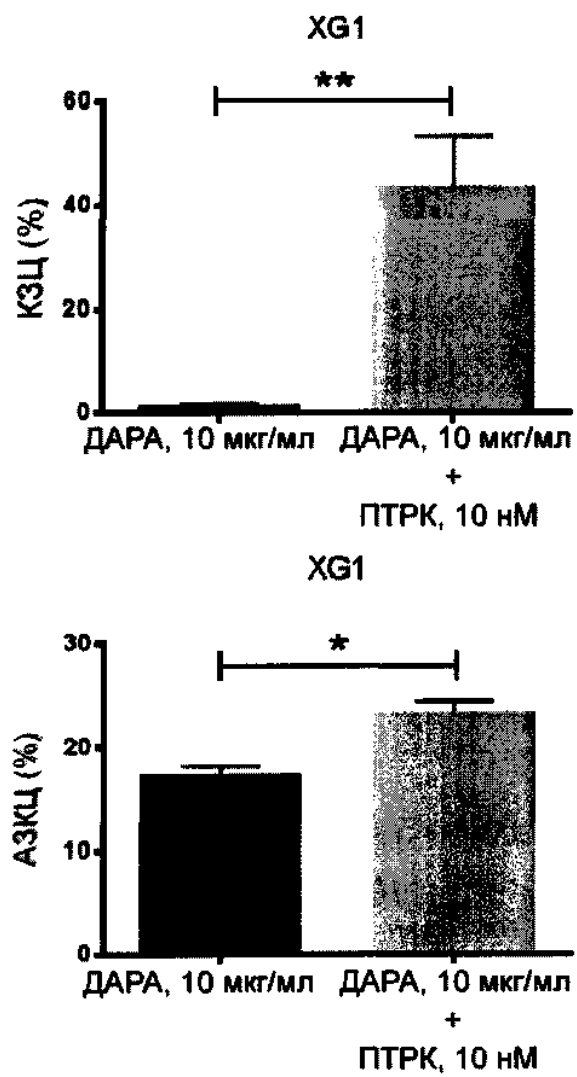


Fig. 3A.



Фиг. 3В.

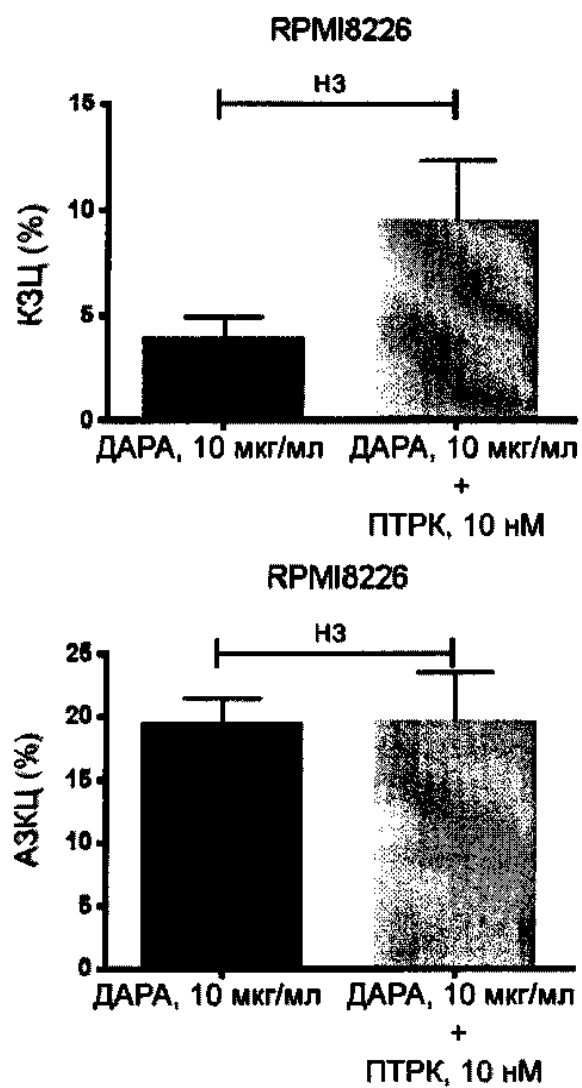
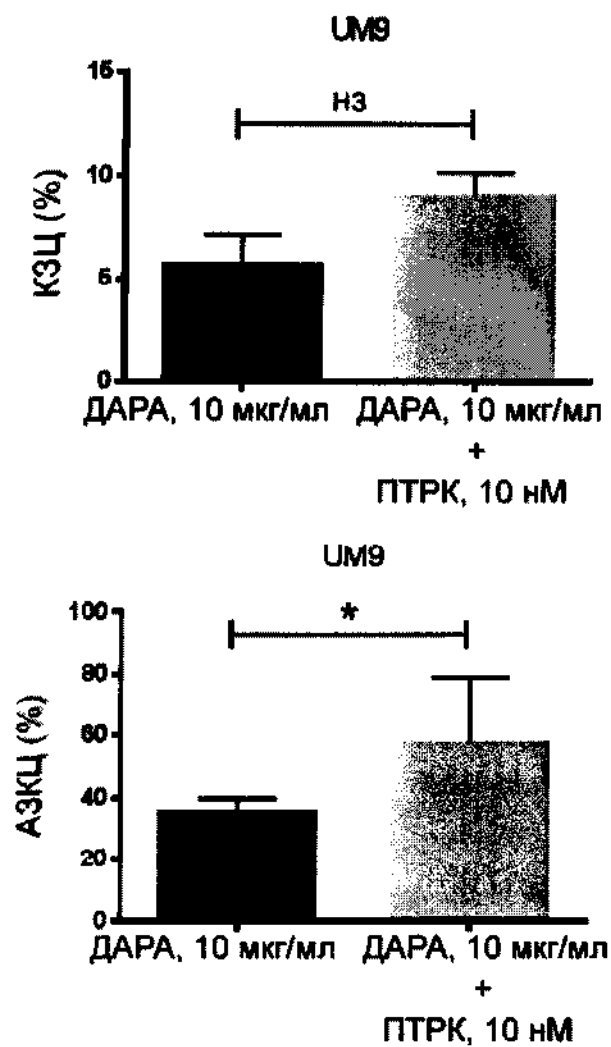


Fig. 3C.



Фиг. 4А.

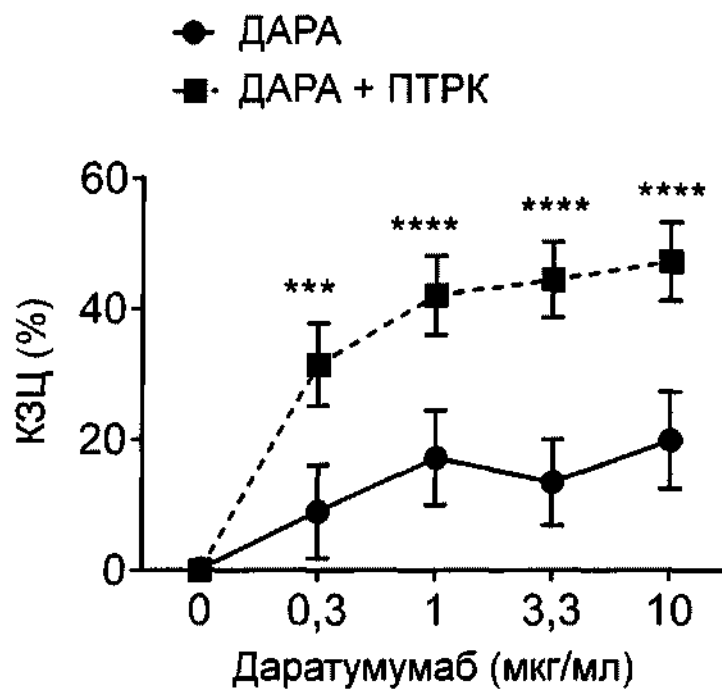




Fig. 4B.

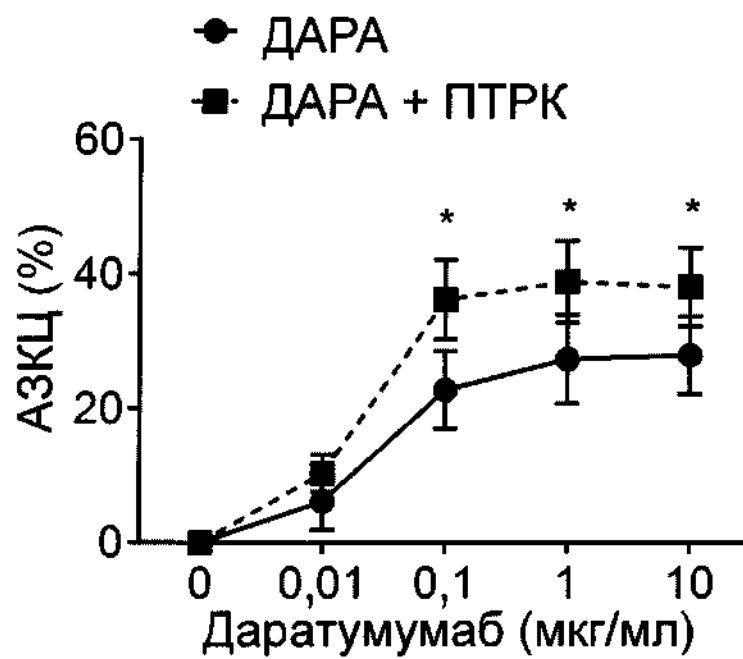
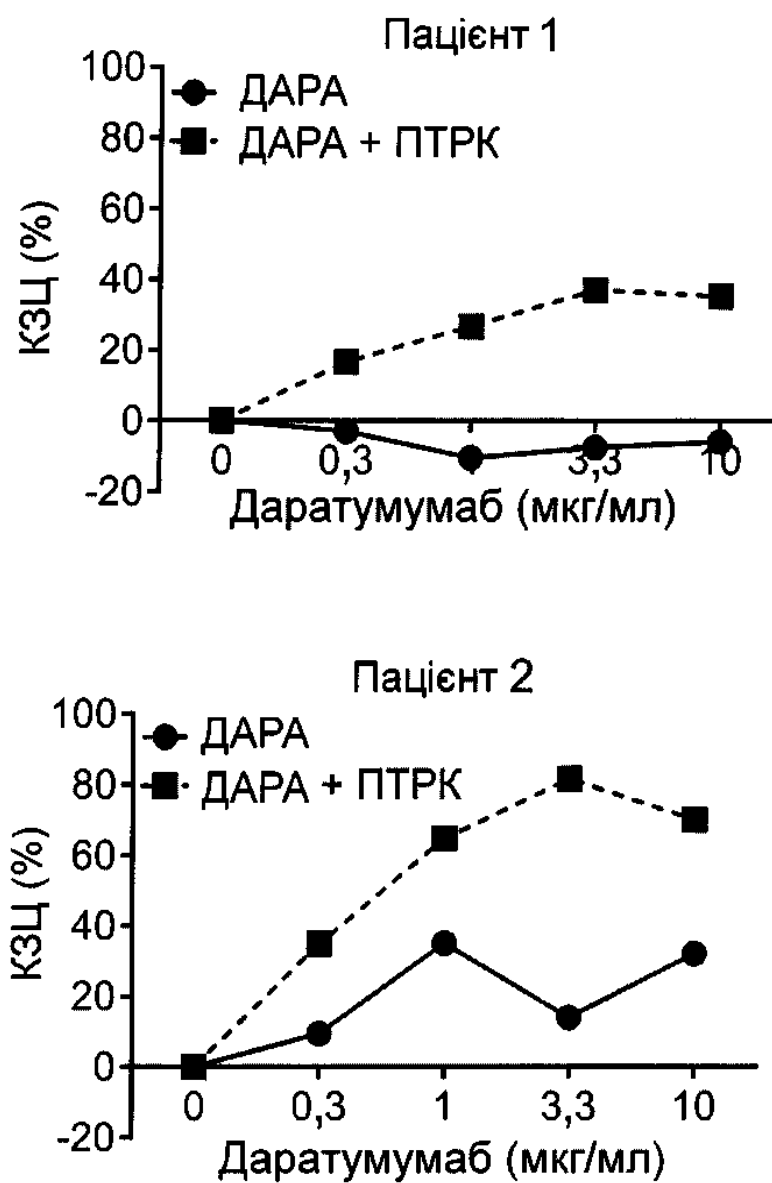


Fig. 5A.



Фіг. 5В.

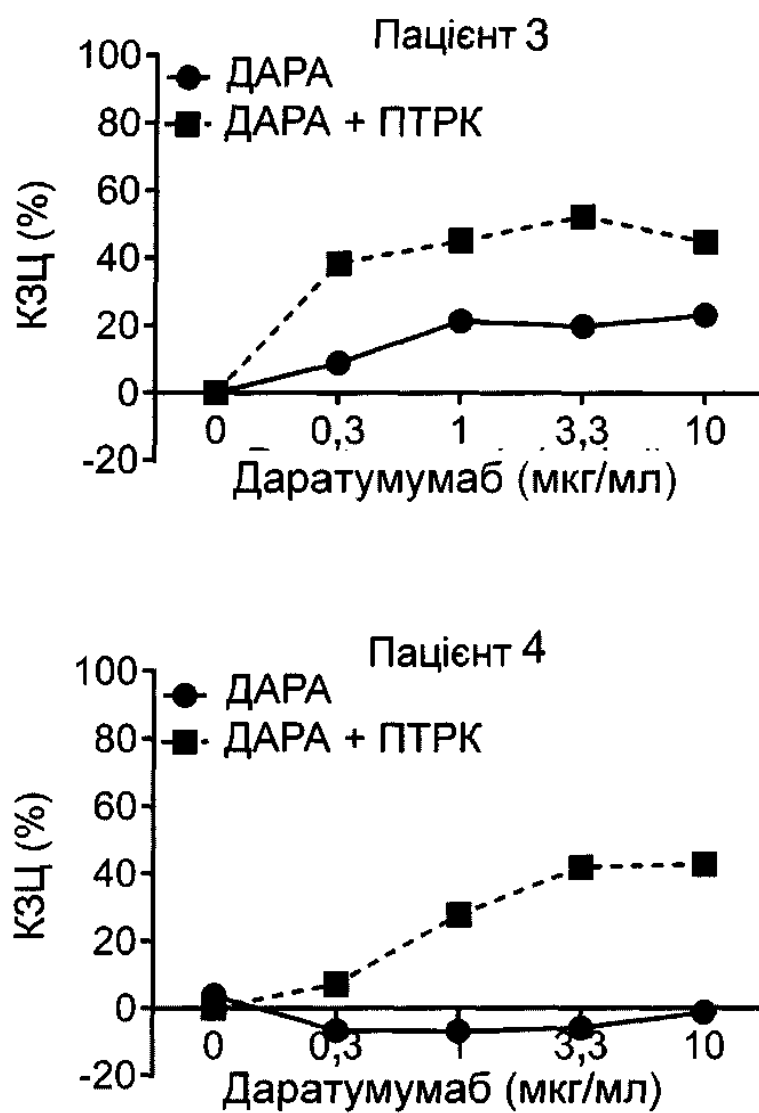
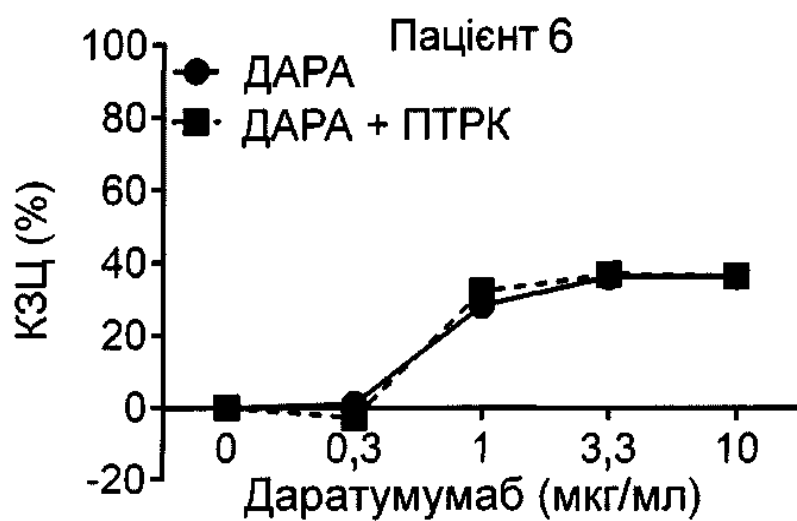
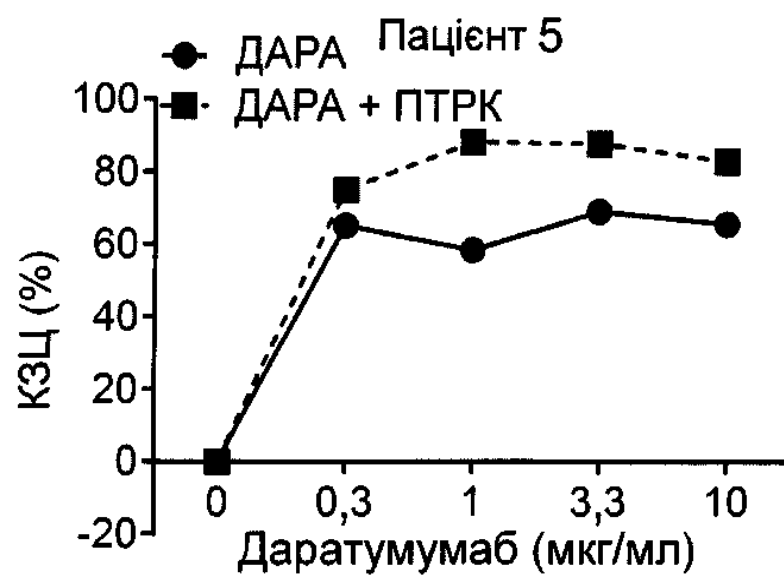
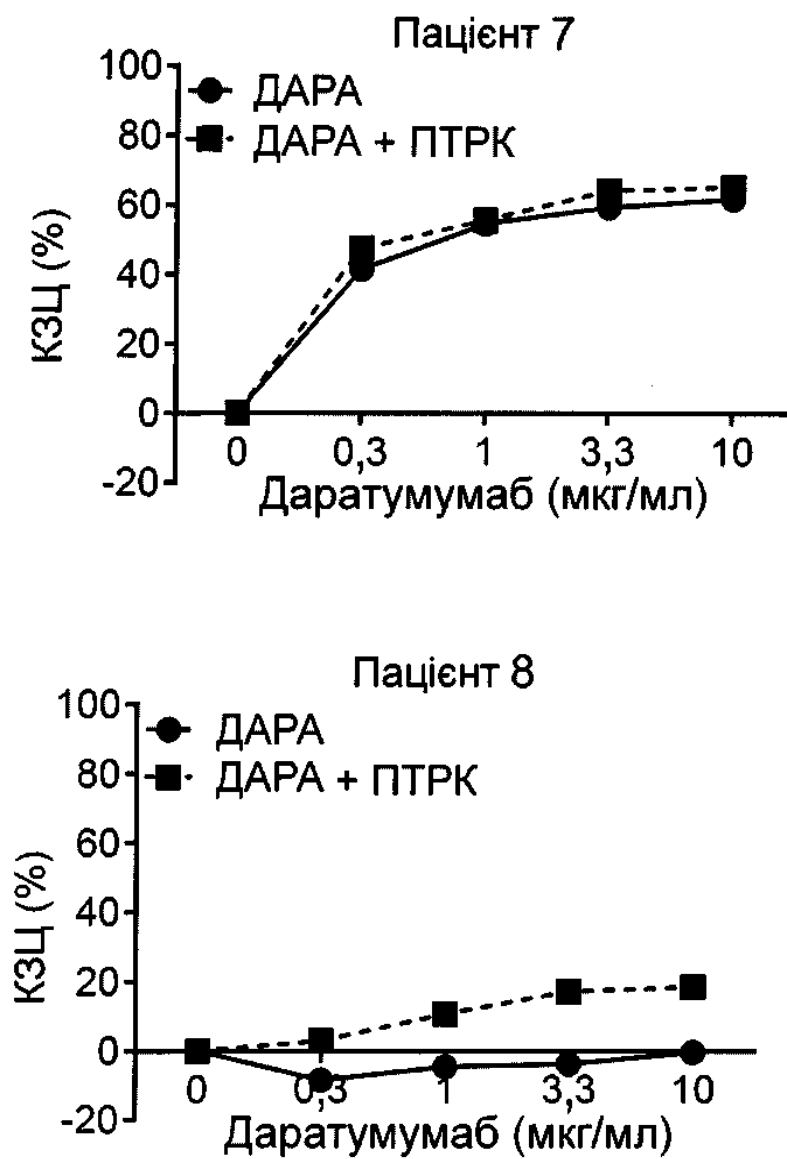


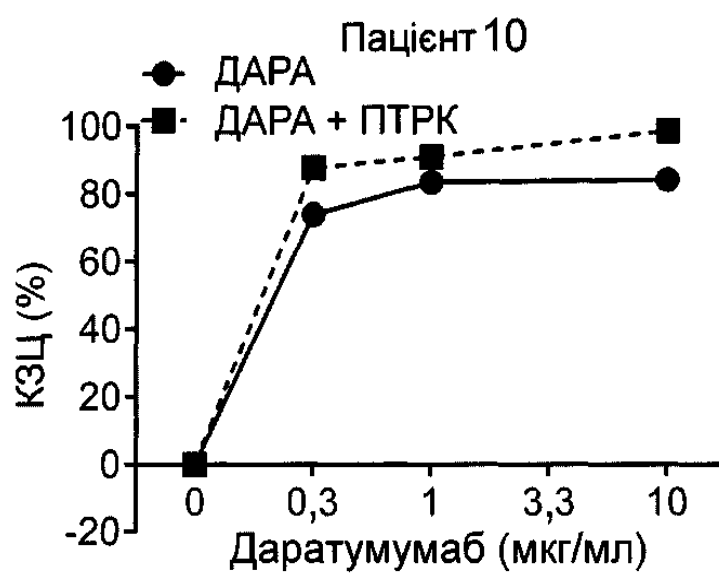
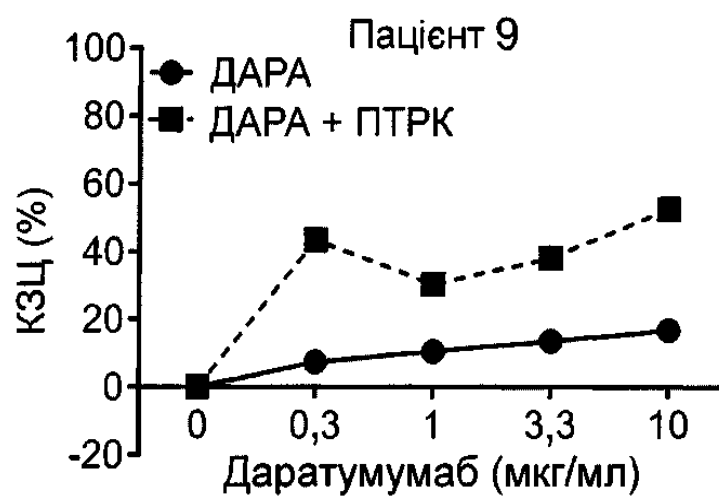
Fig. 5C.



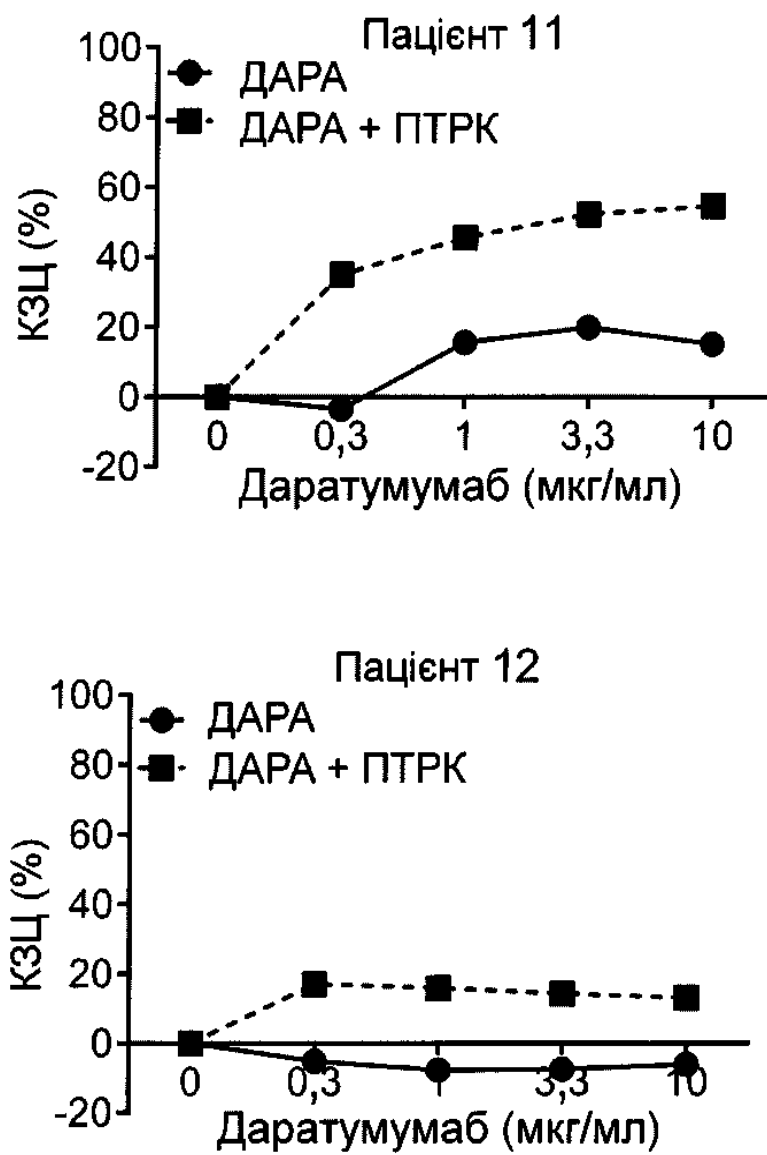
Фиг. 5D.



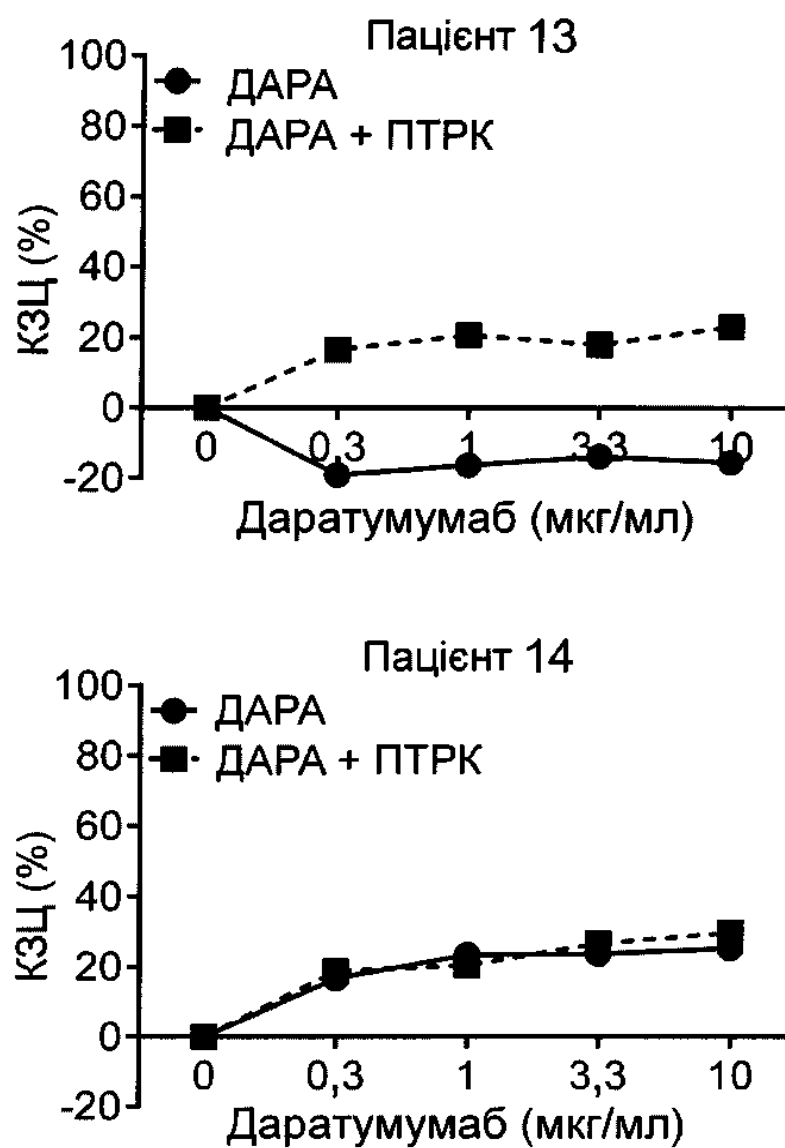
Фиг. 5Е.



Фіг. 5F.

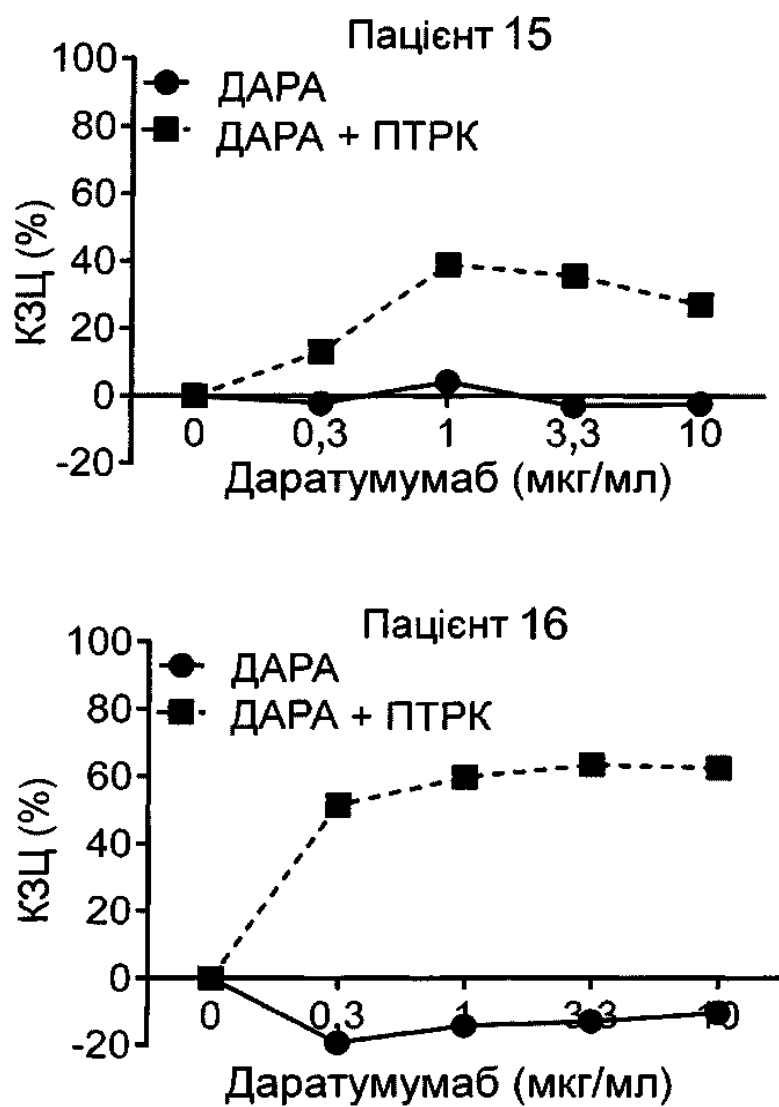


Фіг. 5G.

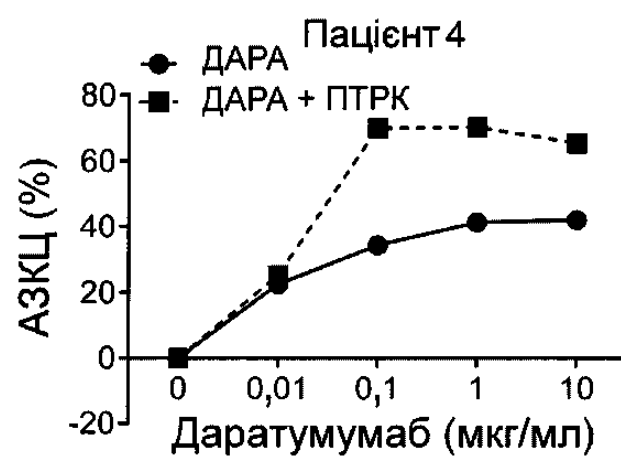
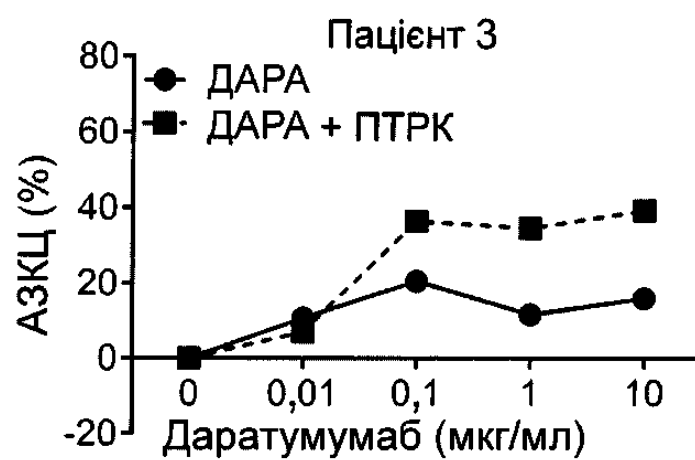




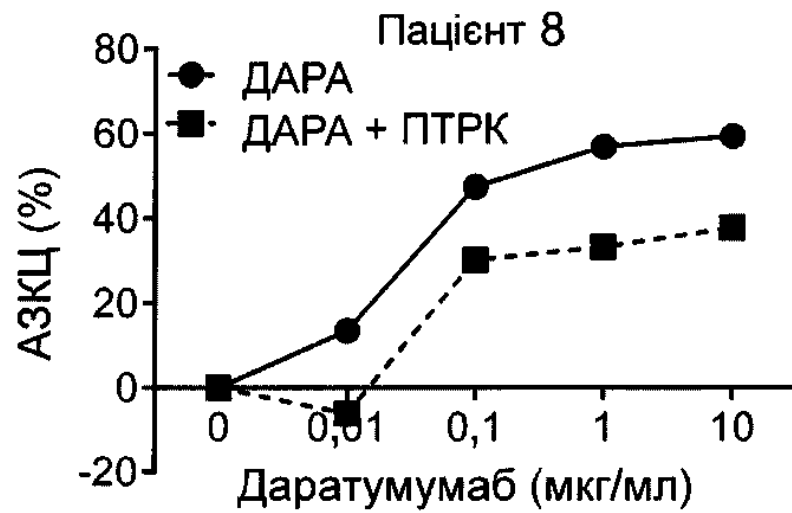
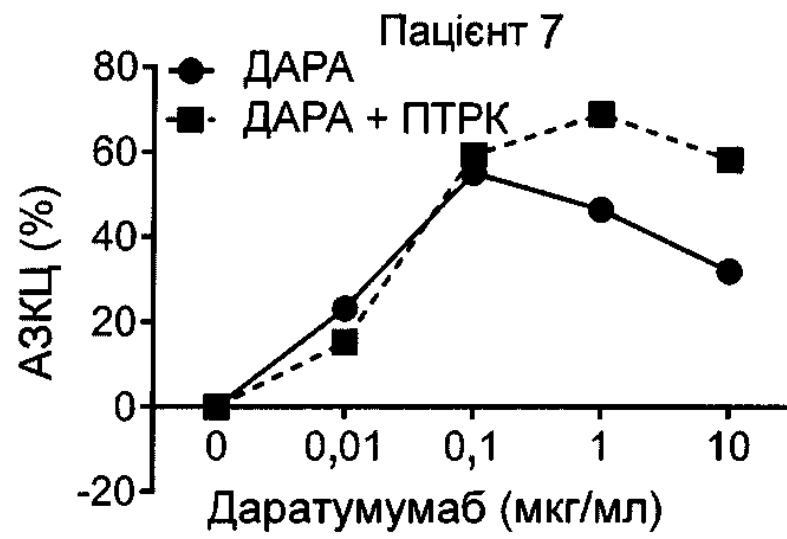
Фиг. 5Н.



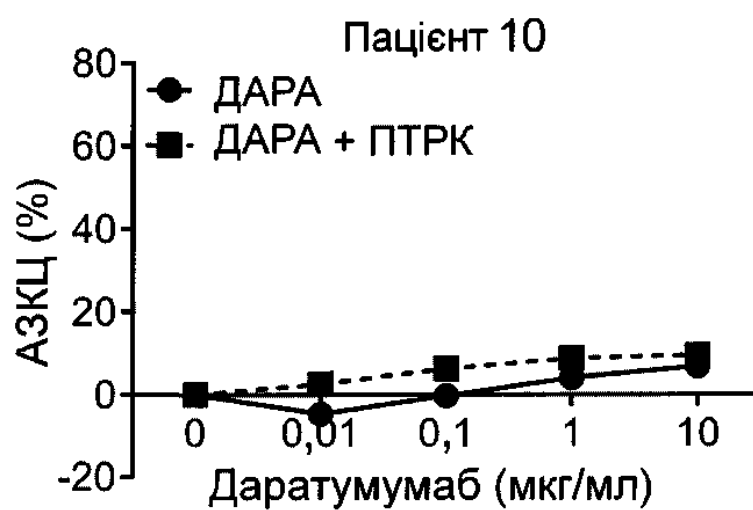
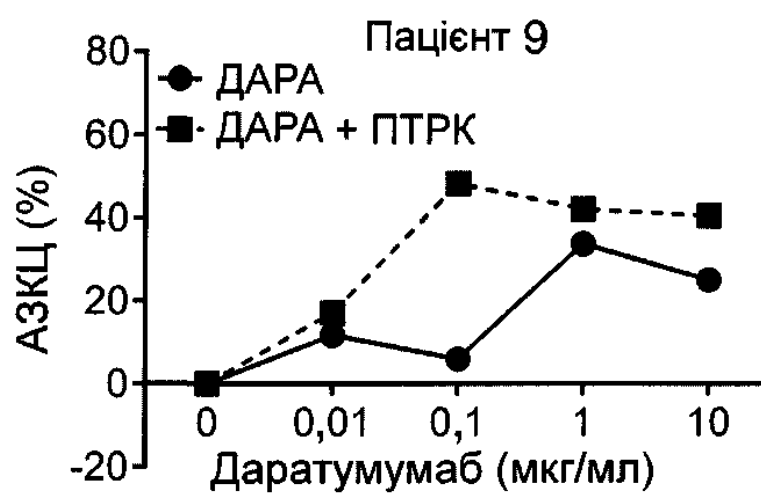
Фіг. 6А.



Фіг. 6В.



Фиг. 6С.



Фиг. 6D.

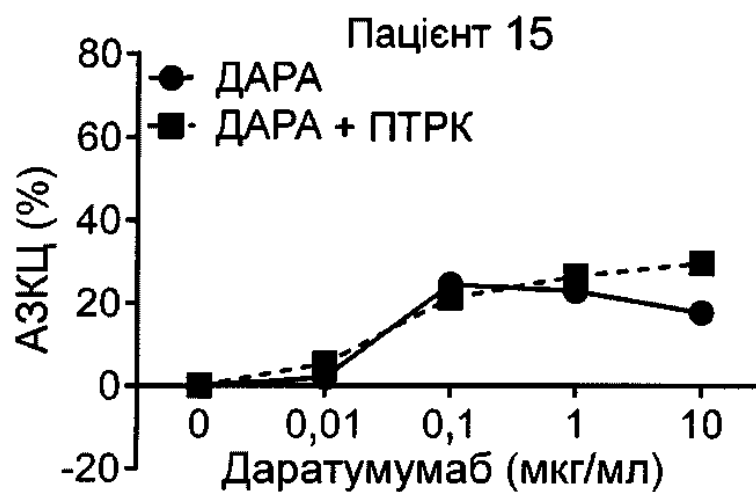
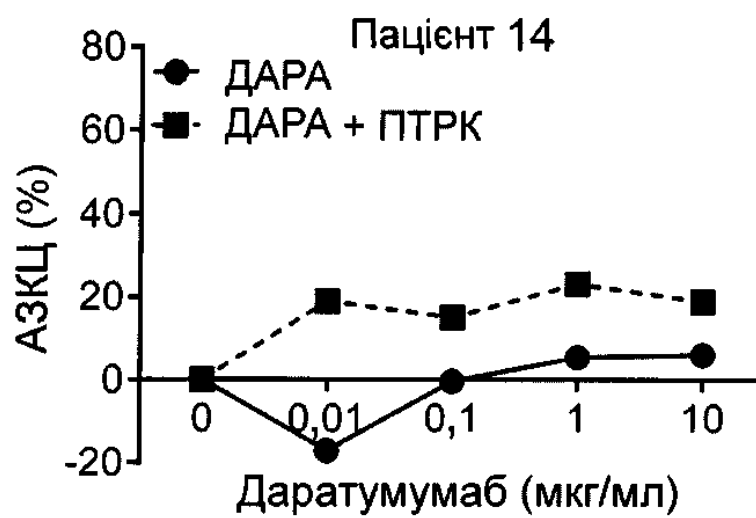
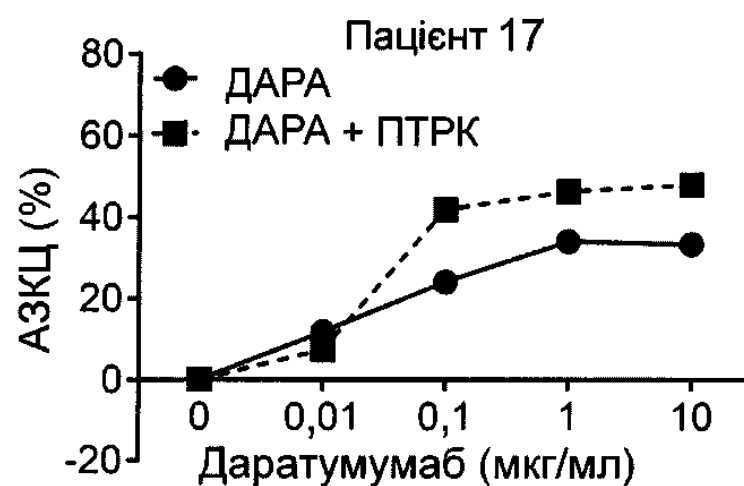
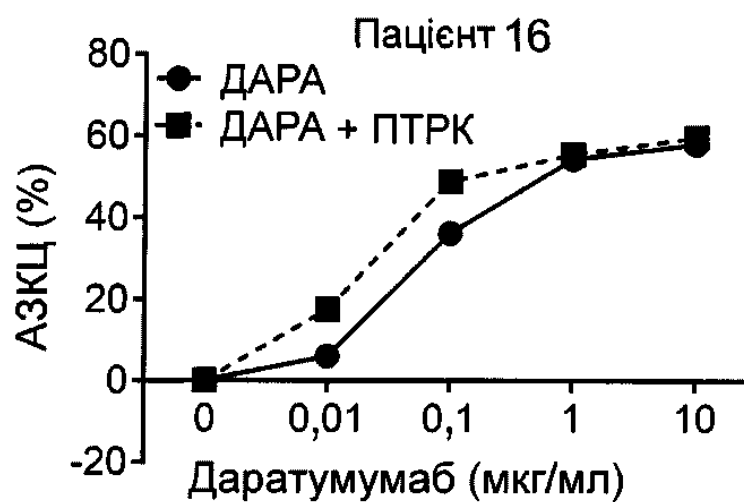
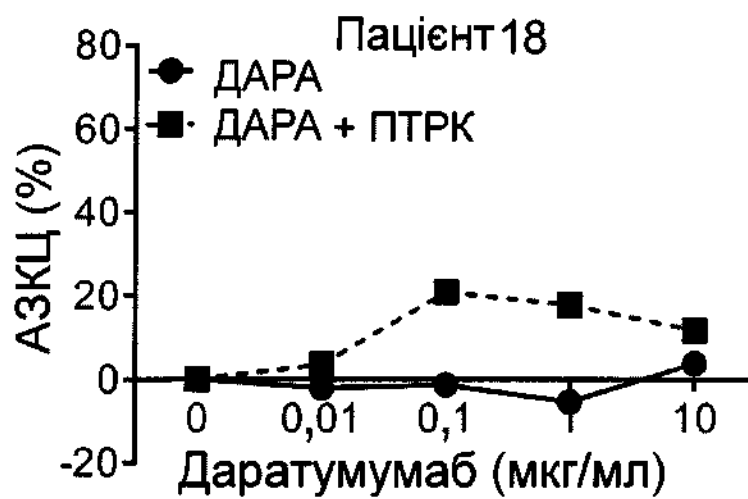


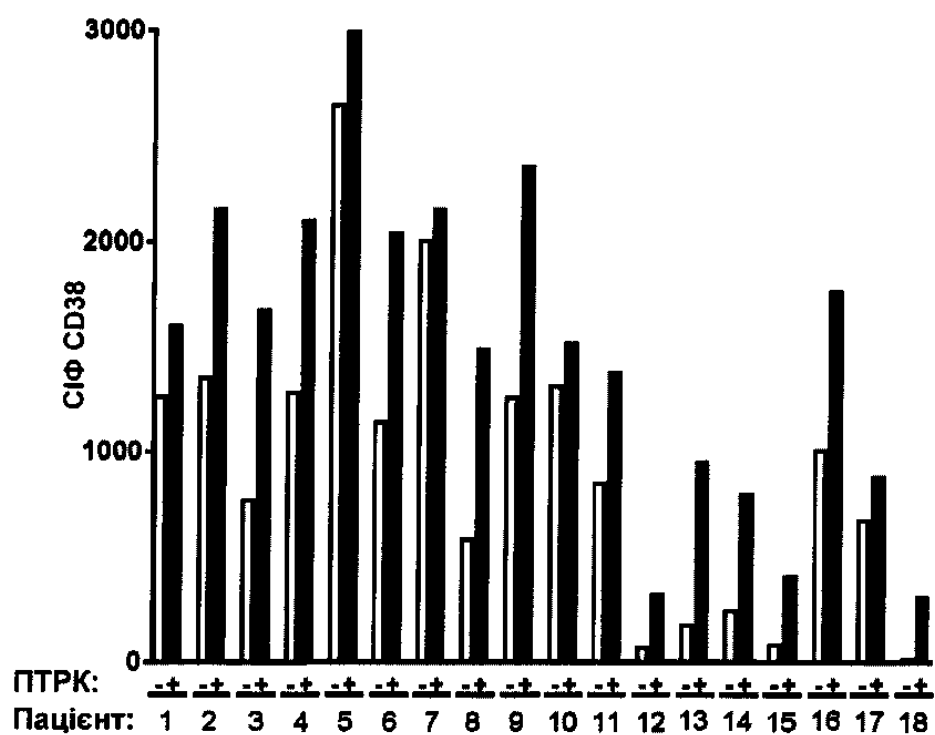
Fig. 6E.



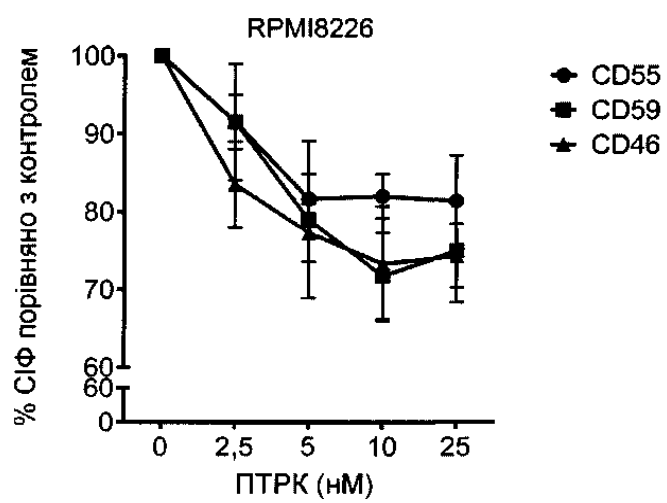
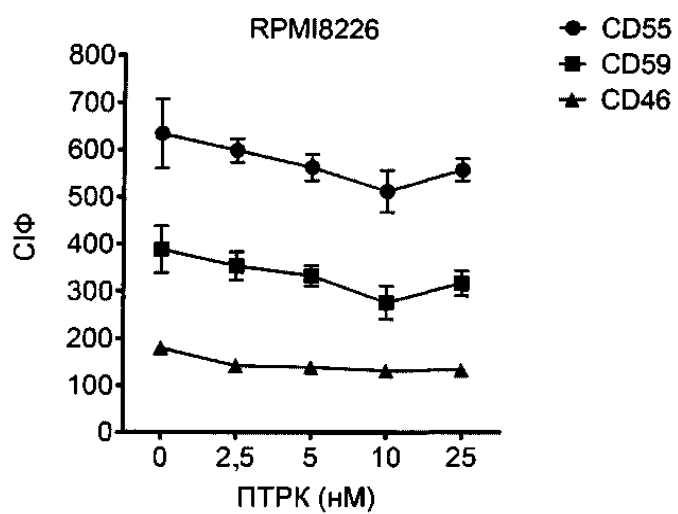
Фіг. 6F.



Фіг. 7.

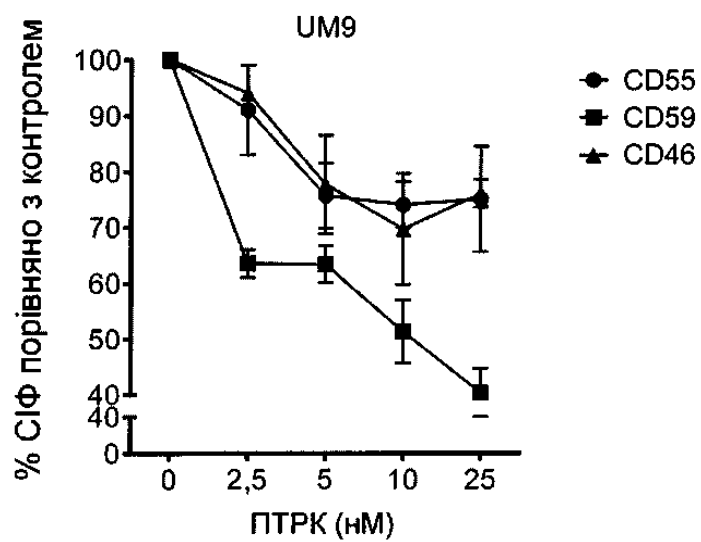
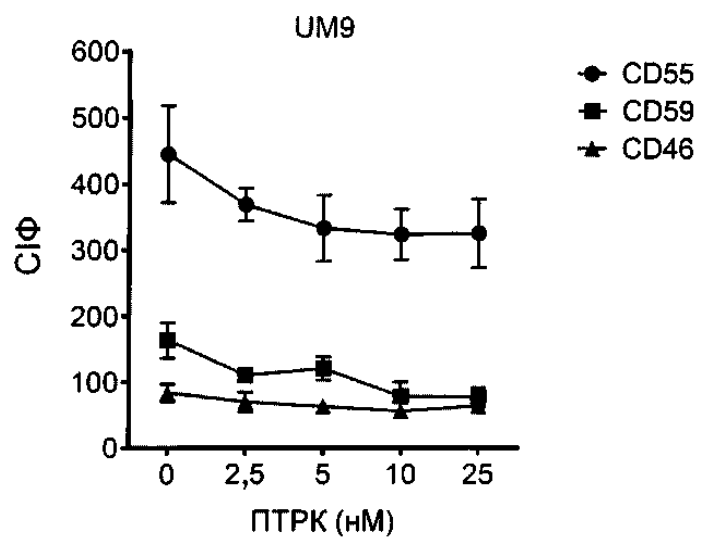


Фиг. 8А.





Фиг. 8В.



Фиг. 8С.

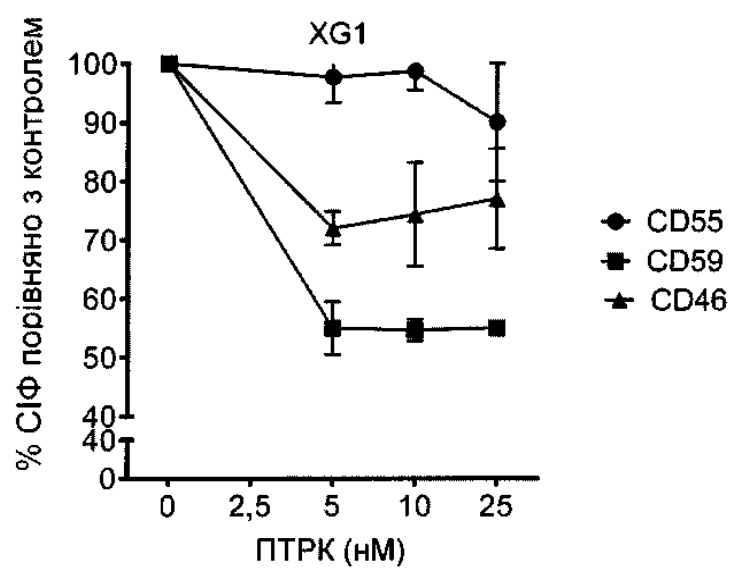
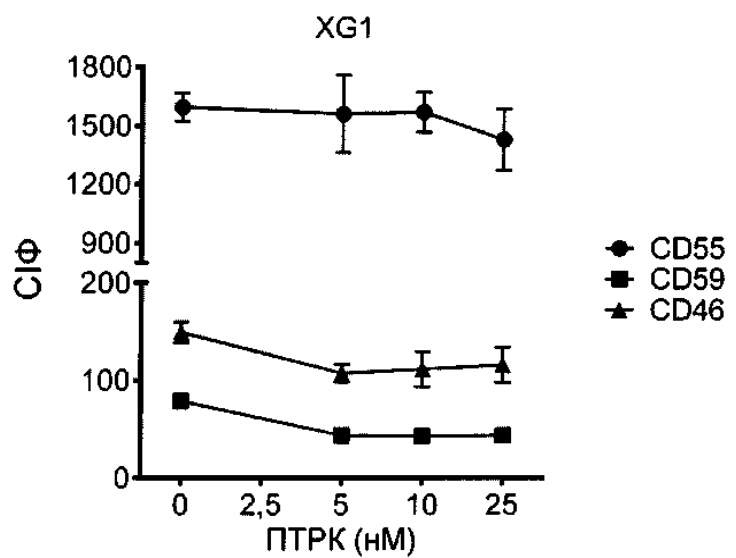


Fig. 9A.

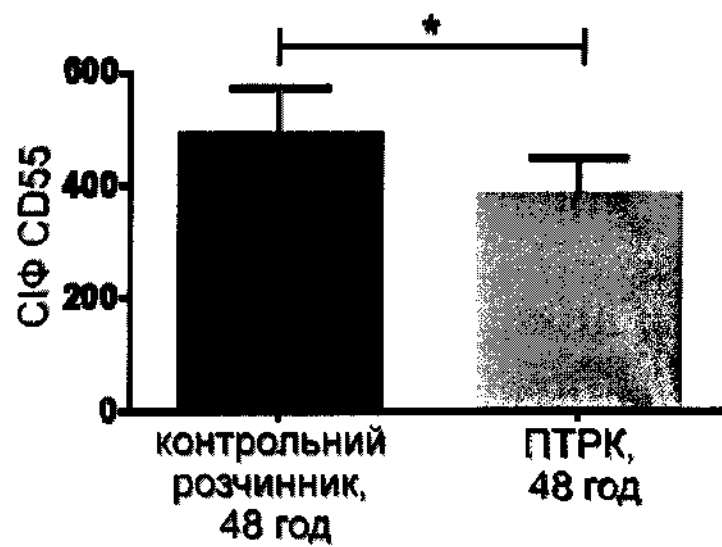
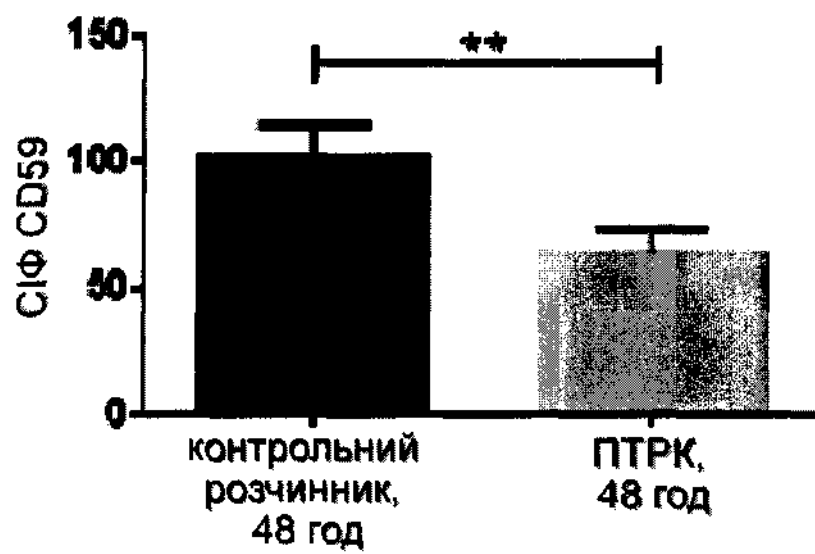
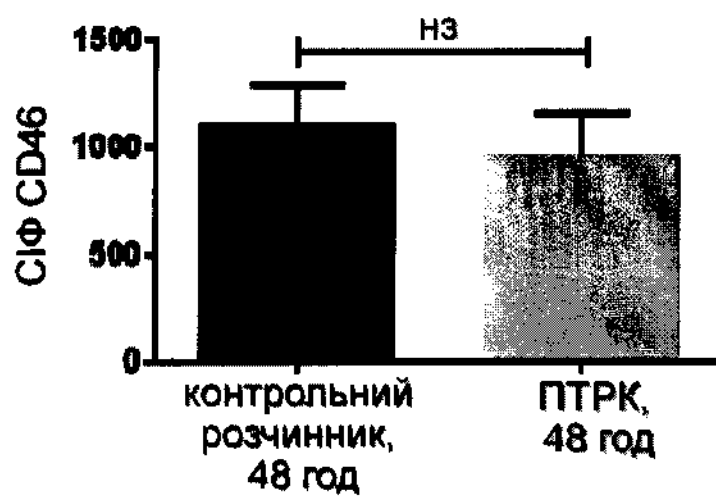


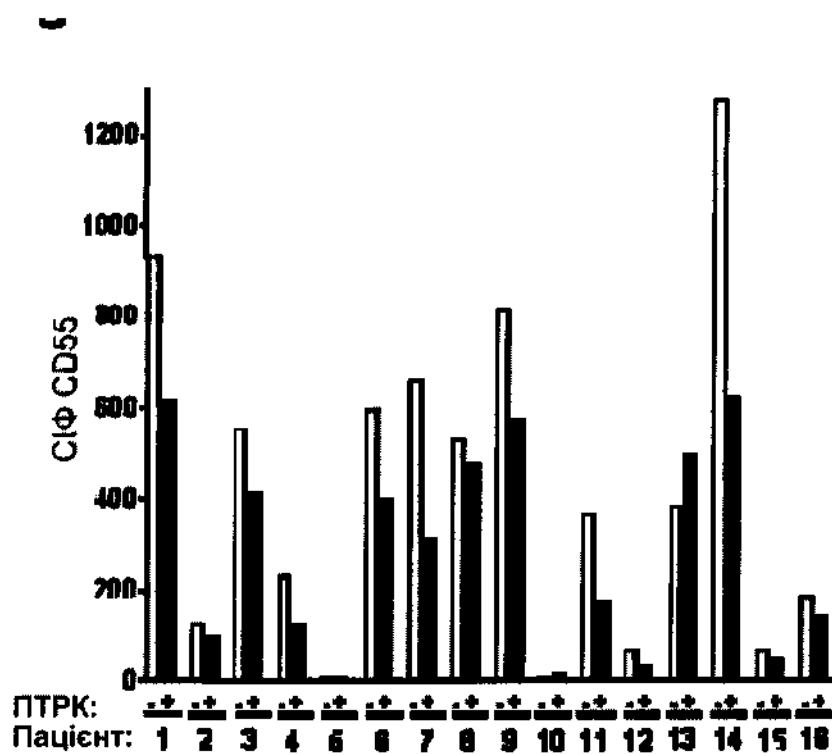
Fig. 9B.



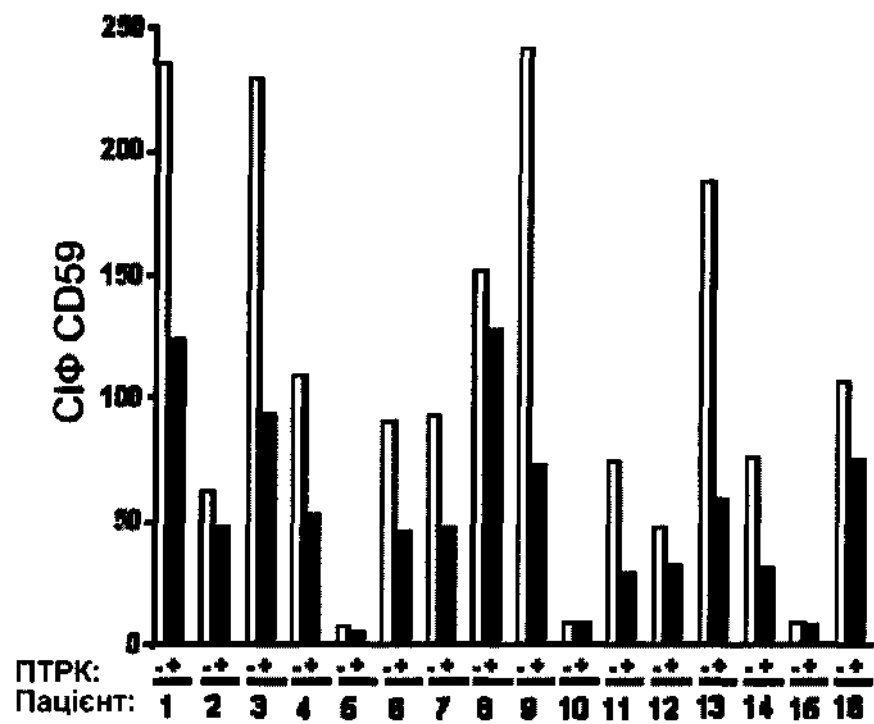
Фиг. 9С.



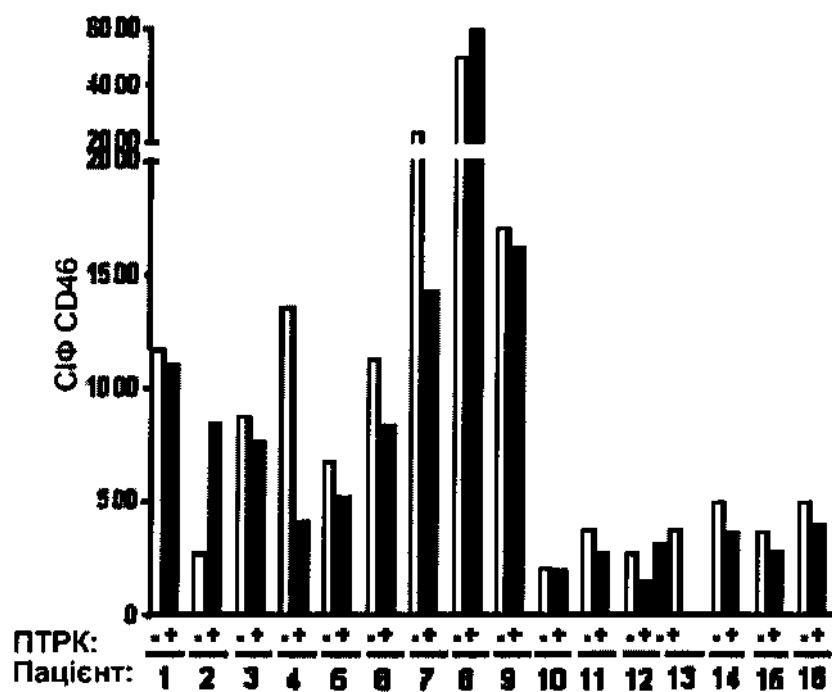
Фиг. 10А.



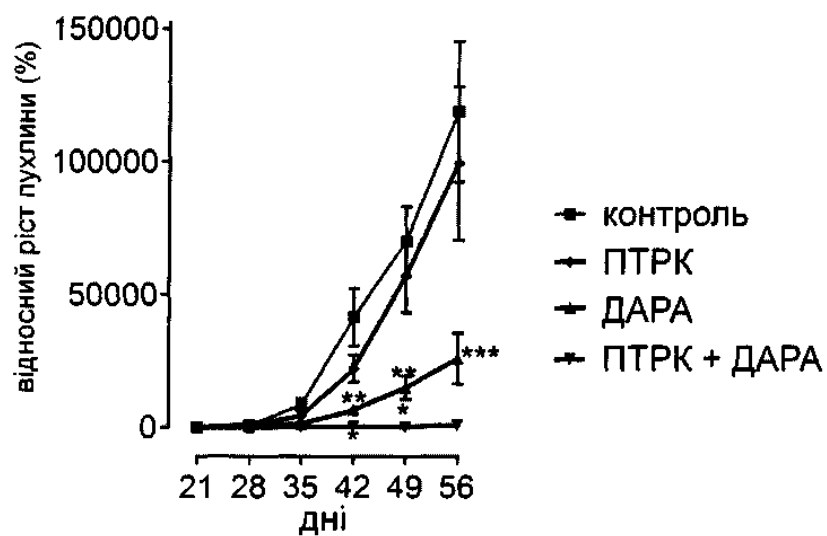
Фиг. 10В.



Фиг. 10С.



Фиг. 11.



---

Комп'ютерна верстка О. Рябко

---

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