

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291811** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.09.23**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.01.15**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/40* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

(54) **ПРЕПАРАТЫ CD38-АНТИТЕЛ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **62/962,028**

(32) **2020.01.16**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/050867**

(87) **WO 2021/144457 2021.07.22**

(71) Заявитель:

**ГЕНМАБ А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

**Клаусен Якоб Д (DK), Хибберт Рихард  
(NL), Далгаард Михаэль Б (DK)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела, связывающиеся с CD38, и к применению указанных композиций при лечении рака и в случае других показаний.

**A1**

**202291811**

**202291811**

**A1**

## ПРЕПАРАТЫ CD38-АНТИТЕЛ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Фармацевтические композиции, содержащие анти-CD38 антитела, и их применение в качестве лекарственных средств, например, для лечения или профилактики рака.

Предшествующий уровень техники

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, который обычно обнаруживается в гемопоэтических клетках и в небольших количествах в солидных тканях. Экспрессия CD38 в гемопоэтических клетках зависит от статуса дифференцировки и активации клетки. Гемопоэтические клетки экспрессируют белок, тогда как зрелые клетки теряют его и снова экспрессируют на активированных лимфоцитах. CD38 также экспрессируется на В-клетках, при этом плазматические клетки экспрессируют особенно высокие уровни CD38. Приблизительно 80% покоящихся НК-клеток и моноцитов экспрессируют CD38 на более низких уровнях, как и различные другие типы гематологических клеток, включая лимфобласты зародышевого центра лимфатических узлов, внутрифолликулярные клетки, дендритные клетки, эритроциты и тромбоциты (Lee and Aarhus 1993; Zocchi, Franco et al. 1993; Malavasi, Funaro et al. 1994; Ramaschi, Torti et al. 1996). Что касается твердых тканей, то CD38 экспрессируется в кишечнике интраэпителиальными клетками и лимфоцитами собственной пластины (lamina propria), клетками Пуркинье и нейрофибрилярными клубками в головном мозге, эпителиальными клетками предстательной железы,  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, остеокластами в костях, клетками сетчатки глаза и сарколеммой гладкой и поперечнополосатой мускулатуры.

CD38 экспрессируется при большом числе гематологических злокачественных новообразований. Экспрессия наблюдалась, в частности, в злокачественных клетках множественной миеломы (MM) (Lin, Owens et al. 2004) и хронического лимфолейкоза (CLL) (Damle 1999), а также сообщалось о макроглобулинемии Вальденстрема (Konoplev, Medeiros et al. 2005), первичного системного амилоидоза (Perfetti, Bellotti et al. 1994), мантийно-клеточной лимфомы (Parry-Jones, Matutes et al. 2007), острого лимфобластного лейкоза (Keyhani, Nuh et al. 2000), острого миелоидного лейкоза (Marinov, Koubek et al. 1993; Keyhani, Nuh et al. 2000), НК-клеточного лейкоза (Suzuki, Suzumiya et al. 2004), НК/Т-клеточной лимфомы (Wang, Wang et al. 2015) и плазмоклеточного лейкоза (van de Donk, Lokhorst et al. 2012).

Другие заболевания, при которых может быть задействована экспрессия CD38,

включают, например, бронхоэпителиальные карциномы легкого, рак молочной железы (развивающийся в результате злокачественной пролиферации эпителиальной выстилки протоков и долек молочной железы), опухоли поджелудочной железы, развивающиеся из  $\beta$ -клеток (инсулиномы), опухоли, развивающиеся из эпителия в кишечнике (например, аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома), карциному предстательной железы, семиномы яичка, рак яичников и нейробластомы. Другие данные также указывают на роль CD38 в аутоиммунных реакциях, таких как болезнь Грейвса и тиреоидит (Antonelli, Fallahi et al. 2001), диабет 1 и 2 типа (Mallone and Perin 2006) и воспаление гладкомышечных клеток дыхательных путей при астме (Deshpande, White et al. 2005). Более того, экспрессия CD38 была связана с инфекцией HIV (Kestens, Vanham et al. 1992; Но, Hultin et al. 1993).

CD38 представляет собой многофункциональный белок. Функции, приписываемые CD38, включают как опосредование рецепторов в процессах адгезии и передачи сигналов, так и (экто-) ферментативную активность. Будучи эктоферментом, CD38 использует  $\text{NAD}^+$  в качестве субстрата для образования циклической АДФ-рибозы (сADPR) и ADPR, а также никотинамида и никотиновой кислоты аденидинуклеотидфосфата (NAADP). Было показано, что сADPR действует как вторичный мессенджер для мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума.

В литературе описано несколько анти-CD38-антител, например, в WO 2006/099875 A1, WO 2008037257 A2, WO 2011/154453 A1, WO 2007/042309 A1, WO 2008/047242 A1, WO 2012/092612 A1, Cotner, Hemler et al. 1981; Ausiello, Urbani et al. 2000; Lande, Urbani et al. 2002; de Weers, Tai et al. 2011; Deckert, Wetzal et al. 2014; Raab, Goldschmidt et al. 2015; Eissler, Filosto et al. 2018; Roepcke, Plock et al. 2018; и Schooten 2018.

CD38-антитела могут воздействовать на опухолевые клетки, экспрессирующие CD38, посредством одного или нескольких из следующих механизмов действия: комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточного фагоцитоза (АКФ), запрограммированной гибели клеток, апоптоза, элиминации иммуносупрессорных клеток и модулирования ферментативной активности (van de Donk, Janmaat et al. 2016; Krejcik, Casneuf et al. 2016; Krejcik, Frerichs et al. 2017; Chatterjee, Daenthansanmak et al. 2018; van de Donk 2018). Однако в 2014 году было высказано предположение, что не было описано CD38-антител, которые могли бы индуцировать эффективные КЗЦ, АЗКЦ, АКФ, а также эффективно ингибировать активность фермента CD38 (Lammerts van Bueren, Jakobs et al. 2014).

Оптимизация эффекторных функций может повысить эффективность терапевтических антител для лечения раковых или других заболеваний, например,

улучшить способность антитела вызывать иммунный ответ на клетки, экспрессирующие антиген. Такие попытки описаны, например, в WO 2013/004842 A2; WO 2014/108198 A1; WO 2018/031258 A1; Dall'Acqua, Cook et al. 2006; Moore, Chen et al. 2010; Desjarlais and Lazar 2011; Kaneko and Niwa 2011; Song, Myojo et al. 2014; Brezski and Georgiou 2016; Sondermann and Szymkowski 2016; Zhang, Armstrong et al. 2017; Wang, Mathieu et al. 2018.

Однако, несмотря на эти и другие усилия в данной области, существует потребность в терапевтических CD38-антителах с модулированной активностью и составах, содержащих такие антитела.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение касается композиций, таких как фармацевтические композиции, включающих CD38-антитело С, содержащее Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 или S440 тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

Итак, в одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

- a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего
  - антигенсвязывающий участок, содержащий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:3 NO:4, VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, и
  - Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU;

- b) 5-40 mM гистидина или ацетата;
- c) 100 – 400 mM сорбита или сахарозы; и
- d) поверхностно-активное вещество.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

- a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего
  - тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4 и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем



аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и

- легкую цепь, включающую VL-область, содержащую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7;

- b) 5-40 mM гистидина или ацетата;
- c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и
- d) поверхностно-активное вещество.

Эти и другие аспекты и воплощения изобретения более подробно описаны ниже.

Подписи к чертежам

На фиг. 1 показано выравнивание аминокислотной последовательности с использованием программного обеспечения Clustal 2.1 для сегментов Fc IgG1m(a), IgG1m(f), IgG2, IgG3 и IgG4, соответствующих остаткам P247-K447 в тяжелых цепях IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, изложенным в Kabat. Показанные аминокислотные последовательности соответствуют остаткам со 130 по 330 в константных областях тяжелой цепи аллотипических вариантов IgG1 человека, обозначенных как IgG1m(za) (SEQ ID NO:64; учетный номер UniProt P01857), IgG1m(f) (SEQ ID NO:65), IgG1m(z) (SEQ ID NO:66), IgG1m(a) (SEQ ID NO:67) и IgG1m(x) (SEQ ID NO:68); остатки с 126 по 326 константной области тяжелой цепи IgG2 (SEQ ID NO:79; учетный номер UniProt P01859); остатки с 177 по 377 константной области тяжелой цепи IgG3 (SEQ ID NO:80; учетный номер UniProt P01860) и остатки с 127 по 327 константной области тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO:81; учетный номер UniProt P01861).

На фиг. 2 показано связывание CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G с клетками NALM16, экспрессирующими CD38, в сравнении с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и изотипическим контрольным антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 2.

На фиг. 3 показано связывание CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G с CD38, экспрессированным на РВМС яванского макака (А) или клетках Daudi, экспрессирующих большое количество копий CD38 человека (В), по сравнению с контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 2.

На фиг. 4 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителами IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G в линиях опухолевых клеток Ramos (А), Daudi (Б), Wien-133 (В), NALM-16 (D), REH (E), RS4; 11 (F), U266 (G) и RC-K8 (H) в анализе КЗЦ по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B и IgG1-C. Дополнительные сведения см. в Примере 3.

На фиг. 5 показано влияние CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на количество жизнеспособных NK-клеток (А), Т-клеток (В) и В-клеток (С) в анализе КЗЦ, проведенном на цельной крови, по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B и IgG1-C. Дополнительные сведения см. в Примере 3.

На фиг. 6 показан процентный лизис клеток Daudi, индуцированный CD38-антителами IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G, в анализе АЗКЦ с высвобождением хрома по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 4.

На фиг. 7 показано дозозависимое перекрестное связывание FcγRIIIa с CD38-антителами IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G в репортерном анализе АЗКЦ по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 4.

На фиг. 8 показано влияние CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на процент макрофагов РКН-29pos, CD14pos и CD19neg в анализе АКФ по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 5.

На фиг. 9 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителами IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G в линиях опухолевых клеток Ramos (А), Daudi (В, С), Wien-133 (D, E) и NALM-16 (F, G) линий опухолевых клеток в анализе апоптоза, проведенном с (С, E, G) или без (А, В, D, F) Fc-перекрестно-связывающего антитела, по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 6.

Фиг. 10 иллюстрирует ферментативную активность CD38.

На фиг. 11 показано влияние CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на циклазную активность HisCD38 (А), клеток Daudi (В) и клеток Wien-133 (С), что отражено % конверсии NDG с течением времени по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и изотипическим контрольным антителом.

На фиг. 12 показано влияние CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на экспрессию CD38 на клетках Daudi после 45-минутного совместного культивирования с макрофагами по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Макрофаги были получены от донора А (А, В) или донора В (В, D), а клетки, опсонизированные антителами, тестировали на экспрессию CD38 (А, В) или окрашивание IgG человека (С, D).

На фиг. 13 показано влияние CD38-антител IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на экспрессию CD38 на регуляторных Т-клетках с РВМС или без них по сравнению с IgG1-B.

На фиг. 14 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителами IgG1-A-E430G (закрашенные треугольники), IgG1-B-E430G (закрашенные кружки) и IgG1-C-E430G (закрашенные квадраты) различных линий В-клеточных опухолевых клеток в анализе КЗЦ по сравнению с антителами IgG1-B к CD38 (незаштрихованные кружки) и контрольным изотипическим антителом (незаштрихованные ромбы). Дополнительные сведения см. в Примере 3.

На фиг. 15 показана сводка некоторых значений EC50, представленных в таблице 4. Показаны значения EC50 для КЗЦ, индуцированного антителами IgG1-B, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на 20 различных линиях В-клеточных опухолевых клеток. Каждый квадрат, треугольник или круг представляет собой отдельную опухолевую В-клеточную клеточную линию. Значения EC50, полученные с клеточными линиями AML, не были включены, поскольку IgG1-B-E430G не тестировалось на клеточных линиях AML.

На фиг. 16 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителом IgG1-C-E430G (закрашенные кружки) различных линий опухолевых клеток AML в анализе КЗЦ по сравнению с CD38-антителами IgG1-B (незакрашенные кружки) и антителом изотипического контроля (закрашенные квадраты). Дополнительные сведения см. в Примере 3.

На фиг. 17 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителами IgG1-B-E430G (закрашенные кружки) и IgG1-C-E430G (закрашенные квадраты) регуляторных Т-клеток в анализе КЗЦ по сравнению с CD38-антителами IgG1-B (незаштрихованные кружки). Дополнительные сведения см. в Примере 3.

На фиг. 18 показан процентный лизис клеток Daudi, Wien-133, Granta 519 и MEC-2, индуцированный CD38-антителами IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G, в анализе АЗКЦ с высвобождением хрома по сравнению с CD38-антителами IgG-B, IgG1-C и IgG1-b12-E430G. Дополнительные сведения см. в Примере 4.

На фиг. 19 показано дозозависимое перекрестное связывание FcyRIIIa CD38-антител IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G в репортерном анализе АЗКЦ с Т-регуляторными клетками по сравнению с CD38-антителами IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C и контрольным изотипическим антителом. Дополнительные сведения см. в Примере 4.

На фиг. 20 показан размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, получавших либо CD38-антитело IgG1-C-E430G, либо PBS (отрицательный контроль). Подробнее см. Пример 9.

На фиг. 21 показана схема анализа для измерения трофоцитоза. 1) Клетки Daudi были помечены РКН-26 (окрашивание мембраны) и фиолетовым клеточным следом (окрашивание цитозоля) и опсонизированы CD38-антителами. 2) Меченые клетки Daudi и макрофаги совместно инкубировали в течение 2 часов при 37°C, чтобы макрофаги могли

прикрепиться. 3) перенос клеточной мембраны или трогоцитоз из клеток Daudi в макрофаги. 4) Разъединение взаимодействия «макрофаг-клетки Daudi» и деградация клеточной мембраны Daudi в макрофаге. Подробнее см. Пример 8.

На фиг. 22 показана комплемент-опосредованная цитотоксичность IgG1-C-E430G или Darzalex® в мононуклеарных клетках костного мозга у 3 впервые диагностированных пациентов с ММ (А, В и D) и у 1 пациента с рецидивирующей/рефрактерной ММ (С).

На фиг. 23 показан процент лизиса, индуцированного CD38-антителом IgG1-C-E430G (закрашенные кружки) различных линий опухолевых клеток ММ в анализе КЗЦ по сравнению с CD38-антителами IgG1-B (незаштрихованные кружки) и антителом изотипического контроля (закрашенные квадраты). Дополнительные сведения см. в Примере 3.

#### Подробное описание изобретения

При описании воплощений изобретения для ясности будет использоваться конкретная терминология. Однако изобретение не предназначено для ограничения выбранными таким образом конкретными терминами, и понятно, что каждый конкретный термин включает все технические эквиваленты, которые действуют аналогичным образом для достижения аналогичной цели.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, включающее по меньшей мере VH CDR1-3 и VL CDR1-3 анти-CD38 антитела С, и Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека.

Как показано в Примере 3, КЗЦ была усилена для всех трех протестированных антител CD38 IgG1 - А, В и С - при введении мутации E430G. Неожиданно, однако, величина усиления КЗЦ отличалась между протестированными клонами антител. Без мутации E430G IgG1-B уже был хорошим индуктором КЗЦ, тогда как IgG1-C и IgG1-A индуцировали умеренную КЗЦ и не индуцировали КЗЦ, соответственно. Тем не менее, после введения мутации E430G, IgG1-C-E430G индуцировал более эффективную КЗЦ по сравнению с IgG1-B-E430G. В опухолевых клетках и регуляторных Т-клетках с более низким уровнем экспрессии CD38 значения EC50 для IgG1-C-E430G были ниже, чем для IgG1-B-E430G.

Антитело может также демонстрировать АЗКЦ. Например, как показано в Примере 4, IgG1-C достигает более высокого максимального процента лизиса по сравнению с IgG1-B в анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr и повышенного связывания FcyRIIIa в репортерном анализе АЗКЦ по сравнению с IgG1-B. Введение мутации E430G снижало максимальный

процент лизиса в анализе высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  и связывание Fc $\gamma$ RIIIa в репортерном анализе АЗКЦ для всех трех антител. IgG1-C-E430G индуцировал аналогичный максимальный процент лизиса по сравнению с IgG1-B-E430G и IgG1-A-E430G в анализе высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  и аналогичное связывание Fc $\gamma$ RIIIa в репортерном анализе АЗКЦ.

Более того, способность анти-CD38 антитела ингибировать активность циклазы CD38 может сохраняться. Например, как показано в Примере 7, IgG1-C-E430G демонстрировал более сильное ингибирование активности циклазы CD38 по сравнению с IgG1-B-E430G, причем первый приводил к ингибированию на около 40%, а второй - на около 25%. Без привязки к теории, можно сказать, что более сильное ингибирование активности циклазы CD38 может снизить продуцирование cADPR, мощного вторичного мессенджера, который регулирует мобилизацию Ca $^{2+}$  из цитозоля, что, в свою очередь, может привести к снижению мобилизации Ca $^{2+}$  и уменьшению передачи сигналов нижестоящих путей, которые контролируют различные биологические процессы, такие как пролиферация и секреция инсулина. Без привязки к теории, можно сказать, что более сильное ингибирование активности циклазы CD38 может, таким образом, влиять, например, на снижение способности клеток-супрессоров иммунитета подавлять иммунный ответ.

Другие функции, которые можно модулировать, включают трофоцитоз. В частности, экспрессия CD38 на клетках Daudi была значительно снижена при совместном культивировании с макрофагами и CD38-антителом; однако снижение экспрессии CD38 было наиболее сильным при использовании антитела с мутацией E430G (Пример 8). Удивительно, но экспрессия CD38 на регуляторных Т-клетках, совместно культивируемых с РВМС, снижалась только после инкубации с E430G-мутантным CD38-антителом; не было обнаружено снижения экспрессии CD38, когда Т-регуляторные клетки инкубировали с антителом В. Без привязки к теории, можно сказать, что способность антител индуцировать трофоцитоз CD38-экспрессирующих неопухольных иммунных клеток, особенно иммуносупрессивных клеток, у ракового пациента может привести к усилению иммунного ответа против опухолевых клеток, независимо от того, экспрессируют ли опухолевые клетки CD38 или нет.

Антитело также может быть способно уничтожать опухолевые клетки *in vivo*, как показано в Примере 9, где две еженедельные дозы IgG1-C-E430G снижали рост опухоли в двух из пяти протестированных моделей DLBCL PDX, которые имели самую высокую экспрессию мРНК CD38.

#### *Определения*

Используемый в данном описании термин «CD38» обычно относится к CD38

человека (UniProtKB - P28907 (CD38\_HUMAN)), имеющему последовательность SEQ ID NO:38, но может также, если не противоречит контексту, относиться к его вариантам, изоформам и ортологам. Варианты человеческого CD38 с мутациями S274, Q272R, T237A или D202G описаны в WO 2006/099875 A1 и WO 2011/154453 A1.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре потенциально связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Пол, В., изд., 2-е изд. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Область CH обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Тяжелые цепи обычно связаны между собой дисульфидными связями в так называемой «шарнирной области». Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи, причем последняя обычно состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют областями, определяющими комплементарность связывания (CDR), между которыми расположены области, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)).

Если иное не указано или не противоречит контексту, последовательности CDR в данном описании идентифицируются в соответствии с правилами IMGT с использованием DomainGapAlign (Lefranc MP., *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. *Nucleic Acids Res.*, 38, D301-307 (2010); см. также [http-адрес](http://www.imgt.org/) в Интернете [www.imgt.org/](http://www.imgt.org/).

Если иное не указано или не противоречит контексту, ссылки на положения аминокислот в CH или Fc-области/Fc-домене в настоящем изобретении соответствуют нумерации EU (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest.* 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242). Аминокислотный остаток в CH другого изотипа, отличного от IgG1 человека, может, однако, альтернативно обозначаться соответствующим положением аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа, в которой аминокислотные остатки

пронумерованы в соответствии с индексом EU. В частности, соответствующее положение аминокислоты может быть идентифицировано, как показано на фиг. 1, т.е. путем (а) выравнивания аминокислотной последовательности константной области, отличной от IgG1 (или ее сегмента), с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи IgG1 человека. цепи (или ее сегмента), в которой аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и (b) идентификации положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1, с которым выровнен аминокислотный остаток. Соответственно, положение такого аминокислотного остатка в данном описании может обозначаться как «аминокислотный остаток в положении, соответствующем», за которым следует положение аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа, пронумерованное в соответствии с индексом EU. Когда речь идет об одном или нескольких различных положениях аминокислот, это может указываться в настоящем описании как «мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений, соответствующих», «мутация в один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих» или просто «мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей», за которыми следуют два или более аминокислотных положения (например, E430, E345 и S440) в тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

Используемый в данном описании термин «шарнирная область» предназначен для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации EU.

Термин «СН2-область» или «домен СН2» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения области СН2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, участок СН2 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231–340 согласно нумерации EU. Однако СН2-область также может представлять собой любую из других подтипов, как раскрыто в данном описании.

Термин «СН3-область» или «домен СН3», используемый в данном описании, предназначен для обозначения области СН3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, участок СН3 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации EU. Однако СН3-область также может представлять собой любую из других подтипов, как раскрыто в данном описании.

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из

них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном. Антитело по настоящему изобретению содержит Fc-область (также называемую в данном описании «Fc-доменом») иммуноглобулина и антигенсвязывающий участок. Антитело обычно содержит два домена СН2-СН3 и соединяющую область, например, шарнирная область, т.е. по меньшей мере Fc-домен. Таким образом, антитело по настоящему изобретению может содержать Fc-область и антигенсвязывающий участок. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина включают домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные или «Fc»-области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации системы комплемента. При использовании в данном описании, если это не противоречит контексту, Fc-область иммуноглобулина обычно содержит по меньшей мере домен СН2 и домен СН3 цепи СН иммуноглобулина и может содержать соединяющую область, например, шарнирную область. Fc-область обычно находится в димеризованной форме за счет, например, дисульфидных мостиков, соединяющих две шарнирные области, и/или нековалентных взаимодействий между двумя СН3-областями. Димер может быть гомодимером (где аминокислотные последовательности двух мономеров Fc-области идентичны) или гетеродимером (где аминокислотные последовательности двух мономеров Fc-области отличаются одной или несколькими аминокислотами). Предпочтительно димер представляет собой гомодимер. Фрагмент Fc-области полноразмерного антитела может быть получен, например, расщеплением полноразмерного антитела папаином, как это хорошо известно в данной области. Антитело, как определено в настоящем описании, может, помимо Fc-области и антигенсвязывающей области, дополнительно содержать одну или обе из области СН1 иммуноглобулина и области СL. Антитело также может представлять собой полиспецифичное антитело, такое как биспецифичное антитело или подобную молекулу. Термин «биспецифичное антитело» относится к антителу, обладающему специфичностями к, по меньшей мере, двум различным, обычно не перекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут быть на одной и той же или на различных мишенях. Если эпитопы находятся на различных мишенях, то такие мишени могут находиться на одной и той же клетке, или на различных клетках, или на различных типах клеток. Как указано выше, до тех пор, пока не установлено иное или очевидно не продиктовано контекстом, термин антитело включает в данном описании фрагменты антитела, которые содержат, по меньшей мере, часть Fc-области и которые сохраняют способность к специфичному



связыванию с антигеном. Такие фрагменты могут быть получены с помощью любого известного метода, такого как ферментативное расщепление, пептидный синтез и метод рекомбинантной экспрессии. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «Ab» или «антитело», включают, без ограничения указанным, моновалентные антитела (описанные в WO2007059782 Genmab); антитела, содержащие только тяжелые цепи, состоящие только из двух тяжелых цепей и встречающиеся в природе, например, у верблюдовых (например, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), сконструированные домены с обменом цепей (SEED или Seed-body), которые представляют собой асимметричные и биспецифические молекулы, подобные антителам (Merck, WO2007110205); Triomab (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al. 1995 J Immunol 155: 219; WO2002020039); Fc $\Delta$ Adp (Regeneron, WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Xmab (Xencor), иммуноглобулин с двумя переменными доменами (Abbott, DVD-Ig, пат. США № 7 612 181); двухдоменные антитела с двойной головной частью (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diabody (ImClone/Eli Lilly), форматы антител типа «выступ-во-впадину» (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), DuetMab (MedImmune, US2014/0348839), форматы электростатически управляемых антител (Amgen, EP1870459 и WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010); биспецифические IgG1 и IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO201117329), LUZ-Y (Genentech), «Biclonic» (Merus, WO2013157953), антитела с двойным целевым доменом (GSK/Domantis) или антитела «два в одном» или Fab двойного действия, распознающие две мишени (Genentech, NovImmune, Adimab), перекрестно-сшитые Mab (онкологический центр Karmanos), ковалентно слитые mAb (AIMM), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen ilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), IgG-подобные биспецифические (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74), TIG-тело, DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine), перенацеливаемые молекулы с двойной аффинностью (Fc-DART или Ig-DART, от MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), варианты с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US7262028) или обычными тяжелыми цепями (Bodies by NovImmune, WO2012023053), а также гибридные белки, содержащие полипептидную последовательность, объединенную с фрагментом антитела, содержащим Fc-область, подобные scFv-гибридам, таким как BsAb от ZymoGenetics/BMS, HERCULES от Biogen

Idec (US007951918), SCORPIONS от Emergent BioSolutions/Trubion и Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), гибрид scFv от Genentech/Roche, гибрид scFv от Novartis, гибрид scFv от Immunomedics, гибрид scFv от Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb от Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb2 от f-Star (WO 2008/003116) и двойные гибриды scFv. Следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, включает моноклональные антитела (такие как человеческие моноклональные антитела), поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, моноспецифические антитела (такие как бивалентные моноспецифические антитела), биспецифические антитела, антитела любого изотипа и/или аллотипа; смеси антител (рекомбинантные поликлоны), например, полученные с помощью технологий, используемых Symphogen и Merus (Oligoclomics), мультимерные белки Fc, описанные в WO 2015/158867, и гибридные белки, описанные в WO 2014/031646. Хотя эти различные фрагменты и форматы антител обычно включаются в определение антитела, они вместе и каждый независимо являются уникальными признаками настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и полезность.кλ

«CD38-антитело» или «анти-CD38 антитело», как раскрыто в настоящем описании, представляет собой антитело, которое специфически связывается с антигеном CD38.

При использовании в данном описании, подразумевается, что термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вставки или делеции, введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако, при использовании в данном описании, подразумевается, что термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были пересажены в человеческие каркасные последовательности.

При использовании в данном описании, термины «моноклональное антитело», «моноклональное Ab» или «композиция моноклональных антител» относятся к препарату Ab-молекул одиночной молекулярной композиции. Молекулы Ab композиции моноклонального антитела могут быть моноспецифическими, проявляющими единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу, или

мультиспецифичными, такими как биспецифические. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к моноспецифичным или мультиспецифичным антителам, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, включающий репертуар трансгенов тяжелой цепи человека и репертуар трансгенов легкой цепи, реаранжированные для получения функционального человеческого антитела, и объединенную с иммортализованной клеткой. Человеческие mAb также могут быть получены рекомбинантными способами.

Используемый в данном описании термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов, который кодируется генами константной области тяжелой цепи, включая, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE и IgM, а также любыми их аллотипами, такими как IgG1m(z), IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(f), и их смешанными аллотипами, такими как IgG1m(za), IgG1m(zax), IgG1m(fa) и т.д. (см., например, de Lange, *Experimental and Clinical Immunogenetics* 1989;6(1):7–17).

Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать с легкой цепью каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ). Используемый в данном описании термин «смешанный изотип» относится к Fc-области иммуноглобулина, полученной путем объединения структурных признаков одного изотипа с аналогичной областью из другого изотипа, с получением тем самым гибридного изотипа. Смешанный изотип может включать Fc-область, имеющую последовательность, состоящую из двух или более изотипов, выбранных из следующих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE или IgM, таким образом, генерируя комбинации, такие как, например, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 или IgG1/IgA.

Термин «полноразмерное антитело» при использовании в настоящем описании относится к антителу, которое содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи, соответствующие тем, которые обычно обнаруживаются в антителе дикого типа рассматриваемого изотипа, за исключением любых указанных мутаций.

«Полноразмерное бивалентное моноспецифическое моноклональное антитело», используемое в данном описании, относится к двухвалентному моноспецифическому антителу, образованному парой идентичных HC и парой идентичных LC, с константными и переменными доменами, соответствующими доменам, обычно присутствующими в антителе конкретного рассматриваемого изотипа, за исключением любых указанных

мутаций.

Термин «антигенсвязывающий участок», «антигенсвязывающая область», «связывающая область» или антигенсвязывающий домен в контексте настоящего описания относится к области антитела, которая способна связываться с антигеном. Эта область связывания обычно определяется доменами VH и VL антитела, которые могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Антиген может быть любой молекулой, такой как полипептид, т.е. присутствует на клетке.

Термин «мишень» в контексте настоящего описания относится к молекуле, с которой связывается антигенсвязывающая область антитела. Мишень включает любой антиген, на который направлено индуцированное антитело. Термин «антиген» и «мишень» применительно к антителу могут использоваться взаимозаменяемо и иметь одинаковое значение и цель с точки зрения любого аспекта или воплощения настоящего изобретения.

Термин «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с вариабельным доменом антитела. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, прекращается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании.

Используемый в данном документе описании «вариант» относится к последовательности белка или полипептида, которая отличается одним или несколькими аминокислотными остатками от референсной последовательности. Вариант может, например, иметь последовательность, по меньшей мере на 80%, например на 90%, или 95%, или 97%, или 98%, или 99% идентичную референсной последовательности. Так же или альтернативно вариант может отличаться от референсной последовательности на 12 или менее, например, на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ии), такие как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены как замены в следующих классах аминокислот:

- Кислотные остатки: Asp (D) и Glu (E)
- Основные остатки: Lys (K), Arg (R) и His (H)
- Гидрофильные незаряженные остатки: Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q).
- Алифатические незаряженные остатки: Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
- Неполярные незаряженные остатки: Cys (C), Met (M) и Pro (P)
- Ароматические остатки: Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Классы альтернативных консервативных замен аминокислотных остатков:

1. A S T
2. D E
3. N Q
4. R K
5. I L M
6. F Y W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков:

- Остатки, содержащие спиртовые группы: S и T
- Алифатические остатки: I, L, V и M
- Остатки, ассоциированные с циклоалкенилом: F, H, W и Y
- Гидрофобные остатки: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y.
- Отрицательно заряженные остатки: D и E
- Полярные остатки: C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
- Положительно заряженные остатки: H, K и R
- Небольшие остатки: A, C, D, G, N, P, S, T и V.
- Очень маленькие остатки: A, G и S
- Остатки, участвующие в формировании поворота: A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T.
- Гибкие остатки: Q, T, K, S, G, N, D, E и R

Термин «идентичность последовательностей» при использовании в данном описании относится к проценту идентичности между двумя последовательностями как функции количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. процент гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений x 100), принимая во внимание количество промежутков и длину каждого промежутка, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, может быть определен, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов остатков РАМ 120, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970). Другие инструменты для выравнивания последовательностей общедоступны в Интернете и включают, помимо прочего, Clustal Omega и EMBOSS Needle на веб-сайте EMBL-EBI [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). Как правило, можно использовать настройки по умолчанию.

В контексте настоящего изобретения следующие обозначения, если не указано иное, используются для описания мутации; название аминокислоты, которая подвергается мутации, за которой следует номер положения, в которой происходит мутация, а затем то, что охватывает мутация. Таким образом, если мутация представляет собой замену, включается название аминокислоты, которая заменяет предыдущую аминокислоту, если аминокислота удалена, это обозначается знаком «\*», если мутация представляет собой добавление, то добавленная аминокислота вставляется после исходной аминокислоты. Названия аминокислот могут быть представлены однобуквенными или трехбуквенными кодами. Таким образом, замена глутаминовой кислоты в положении 430 на глицин обозначается как E430G, замена глутаминовой кислоты в положении 430 на любую аминокислоту обозначается как E430X, делеция глутаминовой кислоты в положении 430 обозначается как E430\* и добавление пролина после глутаминовой кислоты в положении E430 обозначается как E430EP.

Используемый в данном описании термин «иммуносупрессирующие клетки» относится к иммунным клеткам, которые могут подавлять иммунный ответ у субъекта, например, путем ингибирования активности эффекторных Т-клеток и/или ингибирования пролиферации Т-клеток. Примеры таких иммуносупрессирующих клеток включают, без ограничения указанным, регуляторные Т-клетки (Treg), регуляторные В-клетки (Breg) и супрессирующие клетки миелоидного происхождения (MDSC). Существуют также иммуносупрессирующие НК-клетки, НКТ-клетки, макрофаги и антигенпрезентирующие клетки (APC). Примером фенотипа иммуносупрессирующей НК-клетки является CD56brightCD16-.

«Регуляторные Т-клетки» или «Treg» или «Treg» относятся к Т-лимфоцитам, которые регулируют активность других Т-клеток и/или других иммунных клеток, обычно путем подавления их активности. Примером фенотипа Treg является

CD3+CD4+CD25+CD127dim. Treg могут дополнительно экспрессировать Foxp3. Понятно, что Treg не могут быть полностью ограничены этим фенотипом.

«Эффекторные Т-клетки» или «Teffs» или «Teff» относятся к Т-лимфоцитам, которые выполняют функцию иммунного ответа, такую как уничтожение опухолевых клеток и/или активация противоопухолевого иммунного ответа, что может привести к клиренсу опухолевых клеток из организма. Примеры фенотипов Teff включают CD3+CD4+ и CD3+CD8+. Teff могут секретировать, содержать или экспрессировать такие маркеры, как IFN $\gamma$ , гранзим В и ICOS. Понятно, что Teff не могут быть полностью ограничены этими фенотипами.

«Супрессирующие клетки миелоидного происхождения», или «MDSC», или «MDSC» относятся к специфической популяции клеток гемопоэтической линии, которые экспрессируют маркер макрофагов/моноцитов CD11b и маркер гранулоцитов Gr-1/Ly-6G. Примером фенотипа MDSC является CD11b+HLA-DR-CD14-CD33+CD15+. MDSC обычно также демонстрируют низкую или неопределяемую экспрессию зрелых антигенпрезентирующих клеточных маркеров МНС Class II и F480. MDSC являются незрелыми клетками миелоидного происхождения и могут в дальнейшем дифференцироваться в другие типы клеток, такие как макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, моноциты или гранулоциты. MDSC могут быть обнаружены естественным образом в нормальном костном мозге взрослых людей и животных или в участках нормального кроветворения, таких как селезенка.

«Регуляторные В-клетки» или «Breg» или «Bregs» относятся к В-лимфоцитам, которые подавляют иммунные ответы. Примером фенотипа Breg является CD19+CD24+CD38+. Breg могут подавлять иммунный ответ путем ингибирования пролиферации Т-клеток, опосредованной IL-10, секретлируемым Breg. Понятно, что существуют и другие подмножества Breg, которые описаны, например, в Ding et al., (2015) Human Immunology 76: 615-621.

Используемый в данном описании термин «эффекторная клетка» относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа. Типичные иммунные клетки включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включающие цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфоядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) или рецепторы комплемента и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых воплощениях, эффекторная клетка, такая как, например, естественная клетка-

киллер, способна индуцировать АЗКЦ. Например, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и клетки Купфера, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток-мишеней и/или презентации антигенов другим компонентам иммунной системы и/или связывании с клетками, которые представляют антигены. В некоторых воплощениях, АЗКЦ может быть дополнительно усилена классической активацией системы комплемента, управляемой антителами, приводящей к депонированию активированных фрагментов C3 на клетке-мишени. Продукты расщепления C3 представляют собой лиганды для рецепторов комплемента (CR), таких как CR3, экспрессируемых на миелоидных клетках. Распознавание фрагментов комплемента с помощью CR на эффекторных клетках может стимулировать усиленную АЗКЦ, опосредованную Fc-рецептором. В некоторых воплощениях классическая активация комплемента, управляемая антителами, приводит к появлению фрагментов C3 на клетке-мишени. Эти продукты расщепления C3 могут стимулировать клеточную цитотоксичность, непосредственно зависящую от системы комплемента (CDCC). В некоторых воплощениях эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень, частицу-мишень или клетку-мишень, что может зависеть от связывания антител и опосредовано Fc $\gamma$ R, экспрессируемыми эффекторными клетками. Экспрессия конкретного FcR или рецептора комплемента на эффекторной клетке может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Например, было обнаружено, что экспрессия Fc $\gamma$ RI положительно регулируется интерфероном  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) и/или GCSF. Данная усиленная экспрессия повышает цитотоксическую активность Fc $\gamma$ RI-несущих клеток против мишеней. Эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень, или фагоцитировать или лизировать клетку-мишень. В некоторых воплощениях классическая активация комплемента, управляемая антителами, приводит к появлению фрагментов C3 на клетке-мишени. Эти продукты расщепления C3 могут стимулировать фагоцитоз непосредственно эффекторными клетками или косвенно путем усиления антителоопосредованного фагоцитоза.

Термин «эффекторные функции Fc», используемый в данном описании, относится к функциям, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью, такой как антиген, на клеточной мембране, где эффекторная функция Fc относится к Fc-области полипептида или антитела. Примеры эффекторных функций Fc включают (i) связывание C1q, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), (v) связывание с рецептором Fc-гамма, (vi) антителозависимый клеточный фагоцитоз (АКФ), (vii) комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность



(CDCC), (viii) цитотоксичность, усиленную комплементом, (ix) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредованное антителом, (x) опсонизацию, (xi) трогоцитоз и (xii) комбинация любого из (i)-(xi).

Используемый в данном описании термин «активация комплемента» относится к активации классического пути комплемента, который инициируется большим макромолекулярным комплексом, называемым связыванием C1 с комплексами антитело-антиген на поверхности клетки. C1 представляет собой комплекс, состоящий из 6 белков распознавания C1q и гетеротетрамера сериновых протеаз C1r2C1s2. C1 представляет собой первый белковый комплекс на ранних стадиях классического каскада комплемента, который включает серию реакций расщепления, которые начинаются с расщепления C4 на C4a и C4b и C2 на C2a и C2b. C4b депонируется и образует вместе с C2a ферментативно активную конвертазу, называемую конвертазой C3, которая расщепляет компонент комплемента C3 на C3b и C3a, который образует конвертазу C5. Эта конвертаза C5 расщепляет C5 на C5a и C5b, и последний компонент депонируется на мембране и это, в свою очередь, запускает поздние события активации комплемента, при которых терминальные компоненты комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9 собираются в мембраноатакующий комплекс (MAC). Каскад комплемента приводит к созданию пор в клеточной мембране, что вызывает лизис клетки, также известный как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Активацию комплемента можно оценить, используя эффективность C1q, кинетику КЗЦ, анализы КЗЦ (как описано в WO2013/004842, WO2014/108198) или методом клеточного депонирования C3b и C4b, описанным у Beurskens et al., J Immunol April 1, 2012 vol. 188 no. 7, 3532-3541.

Термин «комплементзависимая цитотоксичность» (CDC), как он используется в настоящем описании, предназначен для обозначения процесса опосредованной антителами активации комплемента, приводящей к лизису клетки, с которой связано антитело, что, без ограничения какой-либо теорией, происходит, как считается, в результате появления пор в мембране, которые образуются в результате сборки так называемого мембраноатакующего комплекса (MAC). Подходящие анализы для оценки КЗЦ известны в данной области и включают, например, анализы *in vitro*, в которых нормальная человеческая сыворотка используется в качестве источника комплемента, как описано в Примере 3. Неограничивающий пример анализа для определения максимального лизиса клеток, экспрессирующих CD38, опосредованного CD38-антителом, или значения EC50 может включать следующие стадии:

(a) посев около 100 000 CD38-экспрессирующих клеток в 40 мкл культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;

- (b) предварительная инкубация клеток в течение 20 минут с 40 мкл серийно разведенного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);
- (c) инкубация каждой лунки в течение 45 минут при 37°C с 20% объединенной нормальной человеческой сывороткой;
- (d) добавление красителя для оценки жизнеспособности и измерение процента лизиса клеток на проточном цитометре;
- (e) определение максимального лизиса и/или расчет значения EC50 с использованием нелинейной регрессии.

Подразумевается, что термин «антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» («АЗКЦ») при использовании в данном описании относится к механизму уничтожения клеток-мишеней или вирионов, покрытых антителами, с помощью клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, которые распознают константную область связанного антитела. Подходящие анализы для оценки АЗКЦ известны в данной области и включают, например, анализы, описанные в Примере 4. Неограничивающие примеры анализов для определения АЗКЦ CD38-экспрессирующих клеток, опосредованного CD38-антителом, могут включать стадии анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  или репортерного анализа, изложенные ниже.

#### Анализ АЗКЦ по высвобождению $^{51}\text{Cr}$

- (a) посев около 5000 меченных  $^{51}\text{Cr}$  CD38-экспрессирующих клеток (например, клеток Daudi) в 50 мкл культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;
- (b) предварительная инкубация клеток в течение 15 минут с 50 мкл серийно разведенного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);
- (c) инкубация каждой лунки в течение 4 часов при 37°C с 500 000 свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) на лунку;
- (d) измерение количества высвободившегося  $^{51}\text{Cr}$  в 75 мкл надосадочной жидкости на гамма-счетчике;
- (e) вычисление процента лизиса клеток как (количество импульсов в минуту – спонтанный лизис клеток в минуту)/(максимальный лизис числа импульсов в минуту – спонтанный лизис клеток в минуту), где количество импульсов в минуту – количество импульсов в минуту.

#### Репортерный анализ для определения АЗКЦ

- (a) посев около 5000 CD38-экспрессирующих клеток (например, клеток Daudi) в объеме 10 мкл в лунки многолуночных планшетов, подходящих для оптических измерений (например, 384-луночные планшеты OptiPlate от PerkinElmer Inc.) в

стандартной среде (например, RPMI 1640), дополненной 25% сыворотки с низким IgG;

(b) инкубация каждой лунки в течение 6 часов при 37°C с 10 мкл сконструированных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток, и 10 мкл серийно разведенных антител CD38 (0,0002- 10 мкг/мл);

(c) инкубация каждой лунки в течение 5 минут при комнатной температуре с 30 мкл субстрата люциферазы и измерение люминесценции.

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» («АКФ»), используемый в данном описании, предназначен для обозначения механизма элиминации клеток-мишеней, покрытых антителами, путем интернализации фагоцитами. Интернализированные клетки-мишени, покрытые антителами, содержатся в пузырьке, называемом фагосомой, который затем объединяется с одной или несколькими лизосомами, образуя фаголизому. Подходящие анализы для оценки АКФ известны в данной области и включают, например, анализ цитотоксичности *in vitro* с макрофагами в качестве эффекторных клеток и видеомикроскопию, как описано van Bij et al. in *Journal of Hepatology* Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677–685, и анализ цитотоксичности *in vitro*, описанный в Примере 5. Неограничивающий пример анализа для определения АКФ экспрессирующих CD38 клеток, опосредованного CD38-антителом, может включать следующие стадии:

(a) дифференцировку свежесыведенных моноцитов в макрофаги при 5-дневной инкубации в среде, содержащей GM-CSF;

(b) посев примерно 100000 макрофагов на лунку в многолуночный планшет в среде дендритных клеток с GM-CSF;

(c) добавление 20 000 опсонизированных CD38-антителами CD38-экспрессирующих клеток (например, клеток Daudi), меченных обычным флуоресцентным мембранным красителем, на лунку в течение 45 минут при 37°C;

(d) измерение процентного содержания CD14-положительных, CD19-отрицательных, положительных по мембранному красителю макрофагов на проточном цитометре.

Используемый в данном описании термин «трогоцитоз» относится к процессу, характеризующемуся переносом молекул клеточной поверхности от донорной клетки к акцепторной клетке, такой как эффекторная клетка. Типичные акцепторные клетки включают Т- и В-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и НК-клетки. Опосредованный трогоцитозом перенос молекулы клеточной поверхности, такой

как, например, CD38, из клетки-донора в клетку-акцептор может также заключаться в переносе комплекса антитело-антиген из клетки-донора в клетку-акцептор, т.е. антигенного комплекса, в котором антитело связано с молекулой клеточной поверхности. В частности, специализированная форма трогоцитоза может возникать, когда акцепторными клетками являются эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-гамма-рецептор (Fc $\gamma$ R); эти акцепторные клетки могут поглощать и интернализировать иммунные комплексы, связанные с донорными клетками, состоящие из специфических антител, связанных с антигенами-мишенями на донорных клетках, обычно после связывания Fc $\gamma$ R с Fc-областями антител. Подходящие анализы для оценки трогоцитоза известны в данной области и включают, например, анализ в Примере 8. Неограничивающие примеры анализов для определения трогоцитоза CD38-экспрессирующих клеток, опосредованного CD38-антителом, включают следующее:

*Трогоцитоз (клетки Daudi):*

- (a') дифференцировку свежевыделенных моноцитов в макрофаги с помощью GM-CSF в течение 5 дней;
- (b') посев примерно 100000 макрофагов на лунку в среду дендритных клеток с GM-CSF;
- (c') добавление около 20 000 опсонизированных CD38-антителами клеток Daudi, меченных обычным флуоресцентным мембранным красителем, на лунку в течение 45 минут при 37°C;
- (d') измерение экспрессии CD38 на клетках Daudi на проточном цитометре, где снижение CD38 на опсонизированных CD38-антителами клетках Daudi по сравнению с контролем указывает на трогоцитоз.

*Трогоцитоз (Treg):*

- (a) посев около 500 000 свежевыделенных PBMC на лунку в среду для культивирования клеток в течение ночи при 37°C;
- (b) добавление около 100 000 Treg, опсонизированных CD38-антителами, меченных универсальным флуоресцентным внутриклеточным аминовым красителем, на лунку в течение ночи (O/N) при 37°C; и
- (c) измерение экспрессии CD38 на Treg на проточном цитометре, где снижение CD38 на опсонизированных CD38-антителами Treg по сравнению с контролем указывает на трогоцитоз.

Контроль может быть выбран специалистом в данной области на основе конкретной цели рассматриваемого исследования или анализа. Однако не ограничивающие примеры контролей включают (i) отсутствие какого-либо антитела и (ii)

изотипическое контрольное антитело. Одним из примеров изотипического контрольного антитела является антитело b12, имеющее последовательности VH и VL, приведенные в таблице 1. В некоторых воплощениях, где желательно оценить влияние антитела на трогицитоз, как описано в настоящей заявке, контролем может быть (iii) референсное антитело, имеющее другую антигенсвязывающую область и/или другую Fc-область.

В некоторых воплощениях на стадии (b) в дополнение или вместо флуоресцентного внутриклеточного аминного красителя Treg метят обычным флуоресцентным мембранным красителем.

В некоторых воплощениях на стадии (d') и (c) анализов трогицитоза, описанных выше, также можно измерить снижение CD38-антител на донорских клетках. Например, в случаях, когда CD38-антитело представляет собой антитело IgG человека (huIgG), для обнаружения huIgG можно использовать вторичное антитело.

В дополнение к клеткам Daudi (ATCC CCL-213) опухолевые клетки, подходящие для первого анализа, включают, без ограничения, клетки, перечисленные в таблице 2, в частности клетки с высокой экспрессией CD38.

В дополнение к Treg, подходящие CD38-экспрессирующие клетки для второго анализа включают иммунные клетки, такие как, например, NK-клетки, В-клетки, Т-клетки и моноциты, а также опухолевые клетки, перечисленные в таблице 2, в частности клетки с низким уровнем экспрессии CD38.

Подразумевается, что термин «вектор» при использовании в данном описании относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной индуцировать транскрипцию сегмента нуклеиновой кислоты, лигированного в вектор. Один из типов векторов является «плазмидой», которая представлена в форме циклической двухцепочечной ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, где сегмент нуклеиновой кислоты может быть лигирован в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную последовательность начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (такие как не эписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин, и таким образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В данном описании такие векторы называются «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто «экспрессирующими векторами»). В общем, экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто представлены в виде плазмид. В настоящем изобретении

термины «плазмида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако подразумевается, что настоящее изобретение включает другие типы экспрессирующих векторов, например, вирусные векторы (такие как дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), используемый в данном описании, предназначен для обозначения клетки, в которую введены один или несколько экспрессирующих векторов. Например, НС и LC CD38-антитела, как описано в настоящей заявке, могут кодироваться одним и тем же экспрессирующим вектором и клеткой-хозяином, трансфицированной экспрессирующим вектором. Альтернативно, НС и LC CD38-антитела, как описано в настоящей заявке, могут кодироваться разными экспрессирующими векторами, и клетка-хозяин котрансфицирована экспрессирующими векторами. Следует понимать, что термин «клетка-хозяин» предназначен для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но также и потомства такой клетки. Так как некоторые изменения могут происходить в последующих поколениях либо из-за мутации, либо влияния окружающей среды, то такое потомство может быть фактически не идентичным родительской клетке, но все еще включаться в объем термина «клетка-хозяин», используемый в данном описании. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки PER.C6, клетки NS0 и лимфоцитарные клетки, а также прокариотические клетки, такие как *E. coli*, и другие эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки растений и грибов.

Термин «трансфектома», при использовании в данном описании включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие Ab или антиген-мишень, такие как клетки CHO, PER.C6, клетки NS0, клетки HEK293, растительные клетки или клетки грибов.

Термин «лечение» относится к введению эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению с целью ослабления, облегчения, остановки или устранения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения искомого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьировать в соответствии с такими факторами,

как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты фармацевтической композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

*Конкретные воплощения изобретения*

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, содержащая

- (a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего
  - антигенсвязывающий участок, содержащий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:3 NO:4, VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, и
    - Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU;
  - (b) 5-40 mM гистидина или ацетата;
  - (c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и
  - (d) поверхностно-активное вещество.

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, состоящая в основном из

- (a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего
  - антигенсвязывающий участок, содержащий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:3 NO:4, VL CDR1, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, и
    - Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU;
  - (b) 5-40 mM гистидина или ацетата;
  - (c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и
  - (d) поверхностно-активное вещество.

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, состоящая из

- (a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего

- антигенсвязывающий участок, содержащий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:3 NO:4, VL CDR1, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, и

- Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU;

(b) 5-40 mM гистидина или ацетата;

(c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и

(d) поверхностно-активное вещество,

в водном растворе.

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, содержащая

a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего

- тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4 и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и

- легкую цепь, включающую VL-область, содержащую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7;

b) 5-40 mM гистидина или ацетата;

c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и

d) поверхностно-активное вещество.

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, состоящая в основном из

a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего

- тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4 и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и

- легкую цепь, включающую VL-область, включающую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL



CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7;

- b) 5-40 мМ гистидина или ацетата;
- c) 100 – 400 мМ сорбитола или сахарозы; и
- d) поверхностно-активное вещество.

В одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, состоящая из

a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего  
 - тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4 и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и  
 - легкую цепь, включающую VL-область, содержащую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7;

- b) 5-40 мМ гистидина или ацетата;
- c) 100 – 400 мМ сорбитола или сахарозы; и
- d) поверхностно-активное вещество,  
 в водном растворе.

В некоторых воплощениях фармацевтической композиции по изобретению количество антитела а) может составлять от 1 до 80 мг/мл, например, от 1 до 60 мг/мл, от 1 до 40 мг/мл, от 1 до 30 мг/мл или от 1 до 25 мг./мл; от 2 до 80 мг/мл, например, от 2 до 40 мг/мл или от 2 до 30 мг/мл; или от 10 до 80 мг/мл, например, от 10 до 40 мг/мл или от 10 до 30 мг/мл; или от 15 до 80 мг/мл, например, от 15 до 40 мг/мл, например, от 15 до 25 мг/мл, например, 2 мг/мл, 4 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл, 10 мг /мл, 12 мг/мл, 14 мг/мл, 16 мг/мл, 18 мг/мл, 20 мг/мл, 22 мг/мл, 24 мг/мл, 26 мг/мл, 28 мг/мл, 30 мг /мл, 32 мг/мл, 34 мг/мл, 36 мг/мл, 38 мг/мл, 40 мг/мл или 50 мг/мл. В одном воплощении а) составляет около 20 мг/мл антитела. В особенно предпочтительном воплощении а) составляет 20 мг/мл антитела.

В некоторых воплощениях фармацевтической композиции по изобретению количество гистидина или ацетата b) может составлять от 5 до 30 мМ, например, от 5 до 25 мМ, например, 10 мМ, 11, мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ или 30 мМ. В одном воплощении b) составляет около 20 мМ, например, 20 мМ, гистидина или ацетата. В одном конкретном воплощении b) представляет собой ацетат. В особенно предпочтительном воплощении b) представляет собой гистидин.

В некоторых воплощениях фармацевтической композиции по изобретению количество сорбитола или сахарозы с) может составлять от 100 до 350 мМ, например, от 100 до 300 мМ, от 100 до 260 мМ, от 100 до 200 мМ, от 150 до 350 мМ, от 200 до 300 мМ, от 200 до 260 мМ, от 200 до 350 мМ, от 200 до 300 мМ, от 200 до 260 мМ, от 230 до 350 мМ, от 230 до 300 мМ, от 230 до 260 мМ или от 240 до 260 мМ; такие как 245 мМ, 246 мМ, 247 мМ, 248 мМ, 249 мМ, 250 мМ, 251 мМ, 252 мМ, 253 мМ, 254 мМ или 255 мМ. В одном воплощении с) составляет около 250 мМ, например, 250 мМ, сорбитола или сахарозы. В одном воплощении с) представляет собой сахарозу. В особенно предпочтительном воплощении с) представляет собой сорбитол.

Фармацевтическая композиция может, например, иметь рН от 5,0 до 6,5, например, от 5,5 до 6,5, например, от 5,6 до 6,5, от 5,7 до 6,5, от 5,8 до 6,5, от 5,9 до 6,5, от 6,0 до 6,5, от 5,5 до 6,4, от 5,5 до 6,3, от 5,5 до 6,2, от 5,5 до 6,1, от 5,5 до 6,0, от 5,7 до 6,3, от 5,8 до 6,2, от 5,9 до 6,1. В одном воплощении рН составляет около 6. В одном воплощении рН составляет 6, например, 6,0.

Поверхностно-активные вещества, подходящие для фармацевтической композиции, известны в данной области техники и могут, например, быть выбраны из группы, включающей моноолеат глицерина, хлорид бензетония, докузат натрия, фосфолипиды, полиэтиленалкиловые эфиры, лаурилсульфат натрия и трикаприлин, хлорид бензалкония, цитримид, цетилпиридиний. хлориды и фосфолипиды, альфа-токоферол, моноолеат глицерина, миристиловый спирт, фосфолипиды, полуксамеры, алкиловые эфиры полиоксиэтилена, производные полиоксиэтилена касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксилгидроксистеарат, полиоксиглицериды, полисорбаты, дилаурат пропиленгликоля, монолаурат пропиленгликоля, сложные эфиры сорбитана, пальмитат сахарозы, стеарат сахарозы, трикаприлин и ТПГС. В одном конкретном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. Предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или 80. В одном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 (PS20). В особенно предпочтительном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 (PS80).

Концентрация поверхностно-активного вещества обычно составляет от около 0,005% до 0,5% масс./об., например, от около 0,01 до 0,1% масс./об., например, от около 0,01 до 0,09% масс./об., например, от около 0,01 до 0,06% масс./об. /v, например, от около 0,01 до 0,05% масс./об., например, 0,02% масс./об., или 0,03% масс./об., или 0,04% масс./об., или 0,05% масс./об., или 0,06% масс./об. В одном воплощении концентрация

поверхностно-активного вещества составляет около 0,04% масс./об., например, 0,04% масс./об.

В одном воплощении фармацевтическая композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

- a) от 1 до 80 мг/мл антитела
- b) от 15 до 40 мМ гистидина
- c) от 200 до 300 мМ сорбитола
- d) от 0,01% до 0,1% масс./об. поверхностно-активного вещества.

В одном воплощении фармацевтическая композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

- a) от 10 до 40 мг/мл антитела
- b) от 15 до 40 мМ гистидина
- c) от 200 до 300 мМ сорбитола
- d) от 0,02% до 0,06% масс./об. поверхностно-активного вещества.

В одном воплощении фармацевтическая композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

- a) от 10 до 40 мг/мл антитела
- b) от 15 до 25 мМ гистидина
- c) от 240 до 260 мМ сорбитола
- d) от 0,02% до 0,06% масс./об. поверхностно-активного вещества.

В конкретном воплощении поверхностно-активное вещество d) представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В одном особенно предпочтительном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть стабильной в течение длительного периода времени, такого как период по меньшей мере 8 недель, такого как период 1-60 месяцев, 1-48 месяцев, 1-36 месяцев, 1-30 месяцев, 1-24 месяца, 1-18 месяцев, 1-12 месяцев или 1-6 месяцев; например, в течение 2-60 месяцев, 2-48 месяцев, 2-36 месяцев, 2-30 месяцев, 2-24 месяцев, 2-18 месяцев, 2-12 месяцев или 2-6 месяцев; например, на 3-60 месяцев, 3-48 месяцев, 3-36 месяцев, 3-30 месяцев, 3-24 месяцев, 3-18 месяцев, 3-12 месяцев или 3-6 месяцев, например, на 48 месяцев, 36 месяцев, 30 месяцев, 24 месяца, 18 месяцев, 12 месяцев или 6 месяцев. Предпочтительно фармацевтическая композиция стабильна в течение такого продолжительного периода времени, когда композицию выдерживают при  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C}$

$\pm 3^{\circ}\text{C}$ , около  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  или около  $40^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Стабильность фармацевтической композиции также обычно определяют, когда композицию выдерживают при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , примерно  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  или примерно  $40^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Однако стабильность фармацевтической композиции также или альтернативно можно определить при хранении при  $25^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$  (RH) и/или при хранении при  $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$ .

Способы определения стабильности фармацевтической композиции, содержащей антитело, хорошо известны в данной области и обычно определяют изменение одного или нескольких параметров стабильности от начального момента времени до одного или нескольких более поздних заранее определенных моментов времени. Однако предпочтительно стабильность оценивают по одному или нескольким параметрам:

- (a) подсчет частиц, невидимых невооруженным глазом;
- (b) pH;
- (c) концентрация белка;
- (d) эксклюзионная хроматография;
- (e) изоэлектрическое фокусирование;
- (f) электрофорез в восстанавливающих условиях;
- (g) электрофорез в невосстанавливающих условиях; и/или
- (h) визуальный осмотр.

Например, стабильность можно оценить, путем:

(a) подсчета частиц, невидимых невооруженным глазом с использованием микроскопа с визуализацией микропотоков (MFI), необязательно, как предусмотрено в Примере 12;

(b) определения pH, необязательно как в Примере 11;

(c) определения концентрации белка при поглощении при 280 нм ( $A_{280}$ ), необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(d) определения относительного количества мономеров антитела по сравнению с суммарным количеством мономеров антитела, определения частиц с высокой молекулярной массой (HMW) и частиц с низкой молекулярной массой (LMW), присутствующих в композиции, с использованием эксклюзионной хроматографии, необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(e) определения относительного количества антитела по сравнению с суммарным количеством антитела, определения кислых вариантов антитела и основных вариантов антитела с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (icIEF), необязательно, как представлено в Примере 11;

(f) определения относительного количества суммы легкой цепи и тяжелой цепи по сравнению с суммой легкой цепи, тяжелой цепи и негликозилированной тяжелой цепи по данным капиллярного электрофореза в восстанавливающих условиях, необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(g) определения относительного количества пика антитела по сравнению с суммой антител, определения пиков с молекулярными массами ниже, чем пик антитела, и пиков с молекулярными массами выше, чем пик антитела, по данным капиллярного электрофореза в невосстанавливающих условиях, необязательно, как предусмотрено в Примере 11; и/или

(h) определения внешнего вида, необязательно как в Примере 11.

Один конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 6 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ гистидина,
- c) около 250 мМ сорбитола и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 80.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 6 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ гистидина,
  - c) 250 мМ сорбитола и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,
- в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 6 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ гистидина,
- c) около 250 мМ сорбитола и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 20.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 6 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
- b) 20 мМ гистидина,
- c) 250 мМ сорбитола и
- d) 0,04% масс./об. полисорбата 20,

в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 6 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ гистидина,
- c) около 250 мМ сахарозы и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 80.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 6 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
- b) 20 мМ гистидина,
- c) 250 мМ сахарозы и
- d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,

в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 5,5 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ ацетата,
- c) около 250 мМ сорбитола и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 80.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 5,5 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
- b) 20 мМ ацетата,
- c) 250 мМ сорбитола и
- d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,

в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 6 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ гистидина,
- c) около 250 мМ сахарозы и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 20.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 6 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ гистидина,
  - c) 250 мМ сахарозы и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 20,
- в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 5,5 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ ацетата,
- c) около 250 мМ сорбитола и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 20.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 5,5 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ ацетата,
  - c) 250 мМ сорбитола и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 20,
- в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 5,5 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ ацетата,
- c) около 250 мМ сахарозы и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 80.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 5,5 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ ацетата,
  - c) 250 мМ сахарозы и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,
- в водном растворе.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН около 5,5 и включающую или состоящую, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела,
- b) около 20 мМ ацетата,

- c) около 250 мМ сахарозы и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 20.

Другой конкретный пример представляет собой фармацевтическую композицию, имеющую рН 5,5 и включающую, состоящую или, по существу, состоящую из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ ацетата,
  - c) 250 мМ сахарозы и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 20,
- в водном растворе.

В изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, имеющая рН около 6 и содержащая или состоящая, по существу, из:

- a) около 20 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека,
- b) около 20 мМ гистидина,
- c) около 250 мМ сорбитола и
- d) около 0,04% масс./об. полисорбата 80,

при этом антитело представляет собой полноразмерное двухвалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где

- каждая тяжелая цепь содержит VH-область и CH-область, где VH-область содержит SEQ ID NO:1, а CH-область содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и

- каждая легкая цепь содержит VL-область и CL-область, где VL-область содержит SEQ ID NO:5, а CL-область содержит SEQ ID NO:37.

В одном воплощении фармацевтическая композиция имеет рН около 6 и содержит, состоит или, по существу, состоит из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 мМ гистидина,
  - c) 250 мМ сорбитола и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,
- в водном растворе.

Фармацевтическая композиция может быть введена субъекту или пациенту любым подходящим путем и способом. В одном воплощении, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению вводится парентерально. Термин «парентеральное введение», используемый в данном описании, означает режимы введения отличные от энтерального или местного введения, обычно инъекцией, и включает эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритрахеальную, внутрикапсулярную,



внутриорбитальную, внутрикардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, внутрочерепную, внутригрудную, эпидуральную и надчревную инъекцию или инфузию.

В одном воплощении, фармацевтическую композицию вводят внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией. В конкретном воплощении фармацевтическую композицию вводят внутривенной инъекцией или инфузией.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой концентрат, подлежащий разбавлению, как правило, до или в ходе введения субъекту или пациенту. Подходящие разбавители известны в данной области техники. Предпочтительные разбавители включают, без ограничений, физиологический раствор (0,9% NaCl) и декстрозу (например, 5% масс./об.) в водном растворе.

Изобретение также относится к набору частей для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии, включающему фармацевтическую композицию по изобретению, при этом набор частей необязательно содержит более одной дозы фармацевтической композиции.

В одном воплощении комплект частей включает фармацевтическую композицию по изобретению в одном или нескольких контейнерах, предпочтительно во флаконах.

В одном воплощении набор частей включает более одной фармацевтической композиции по изобретению для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии.

Фармацевтическая композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения может содержать CD38-антитело, дополнительно характеризующееся другими или дополнительными свойствами, как описано ниже.

#### CD38-антитела

##### *Антигенсвязывающий участок и переменные области*

Антигенсвязывающий участок содержит один или несколько переменных доменов антитела, обеспечивающих специфическое связывание с CD38, таких как VH-область и VL-область. Точно так же тяжелая и легкая цепи содержат области VH и VL, соответственно. В дальнейшем ссылка на последовательности в антигенсвязывающем участке может аналогичным образом относиться к последовательностям тяжелой и/или легкой цепи антитела по настоящему изобретению.

Преимущественно, CDR, VH-область и/или VL-область аналогичны или идентичны CDR антитела С, как указано в таблице 1. Предпочтительно антигенсвязывающий участок

и/или тяжелая и/или легкая цепи содержат CDR антитела С, указанные как SEQ ID NO:2 (VH-3003-C\_CDR1), SEQ ID NO:3 (VH-3003 -C\_CDR2), SEQ ID NO:4 (VH-3003-C\_CDR3), SEQ ID NO:6 (VL-3003-C\_CDR1), AAS (VL-3003-C\_CDR2) и SEQ ID NO:7 (VL-3003-C\_CDR3).

Таким образом, в некоторых воплощениях антитело содержит антигенсвязывающий участок, включающий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3 имеющую последовательность SEQ ID NO:4, VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3 имеющую последовательность SEQ ID NO:4, и легкую цепь, включающую VL-область, содержащую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3 имеющая последовательность SEQ ID NO:7.

В предпочтительных воплощениях антитело содержит аминокислотные последовательности VH- и VL-областей антитела С, т.е. VH-область содержит последовательность SEQ ID NO:1 (VH-3003-C), а VL-область содержит последовательность SEQ ID NO:5 (VL-3003-C).

Однако в данной области техники хорошо известно, что мутации в VH и VL антитела могут быть сделаны, например, для увеличения аффинности антитела к его антигену-мишени, снижения его потенциальной иммуногенности и/или увеличения выхода антител, экспрессируемых клеткой-хозяином. Соответственно, в некоторых воплощениях также рассматриваются антитела, содержащие мутации в последовательностях CDR, VH и/или VL антитела С. В частности, такое антитело может отличаться одной или несколькими аминокислотами по сравнению с последовательностью VH и/или VL антитела С, например, одной или несколькими CDR, но его антигенсвязывающий участок предпочтительно сохраняет по меньшей мере значительную часть (по меньшей мере примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности антитела С. Как правило, последовательности VH и/или VL таких антител сохраняют значительную идентичность с последовательностями VH и/или VL антитела С. Например, последовательность области VH и/или VL антитела может отличаться от соответствующей последовательности области VH и/или VL антитела С на 12 или менее, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или

1 мутацию(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях последовательности областей VH, и/или VL, и/или CDR таких антител могут отличаться от соответствующих последовательностей областей VH, и/или VL, и/или CDR антитела С, главным образом, за счет консервативных аминокислотных замен; например, 12, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена аминокислот в варианте могут быть консервативными. В некоторых случаях антитело, содержащее мутации в VH и/или VL антитела С, может обладать большей аффинностью и/или специфичностью, чем антитело С. Для целей настоящего изобретения антитела, содержащие мутации в последовательностях VH и/или VL областей антитела С, которые по сравнению с антителом С позволяют сохранить или улучшить аффинность и специфичность антитела при его связывании с CD38, являются особенно предпочтительными.

Например, в WO 2011/154453 A1 описаны CD38-антитела, содержащие подходящие мутации в аминокислотных последовательностях областей CDR, VH и VL, где аминокислотные остатки в определенных положениях отличаются от остатков в CDR, VH и VL антитела С, как показано в таблице 1. Эти положения, таким образом, представляют собой положения-кандидаты, в которых могут быть сделаны мутации в последовательностях CDR, VH и VL при сохранении или улучшении аффинности и специфичности антитела при его связывании с CD38. В частности, положения в CDR VH и VL, которые могут быть мутированы в VH и VL антитела С, указаны в SEQ ID NO:40-43.

Таким образом, в некоторых воплощениях одна или несколько конкретных мутаций вносятся в CDR, как указано в SEQ ID NO:40-43, т.е. VH-область и/или VL содержит мутации в CDR, а именно в одной или более областях, выбранных из указанных здесь SEQ ID NO:40 (VH CDR1), SEQ ID NO:41 (VH CDR2), SEQ ID NO:42 (VH CDR3) и SEQ ID NO:44 (VL CDR3). Области VH и VL такого антитела могут необязательно содержать исходные каркасные области антитела С. В одном конкретном воплощении антигенсвязывающая область содержит CDRs, показанные в SEQ ID NO:40, где X1 представляет собой S (VH CDR1), SEQ ID NO:41, где X1 представляет собой R, X2 представляет собой K, X3 представляет собой A (VH CDR2), SEQ ID NO:42, где X1 представляет собой A, X2 представляет собой D и X3 представляет собой V (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) и SEQ ID NO:44, где X1 представляет собой S (VL CDR3). В одном конкретном воплощении антигенсвязывающая область содержит CDRs, показанные в SEQ ID NO:40, где X1 представляет собой R (VH CDR1), SEQ ID NO:41, где X1 представляет собой V, X2 представляет собой K, X3 представляет собой T

(VH CDR2), SEQ ID NO:42, где X1 представляет собой T, X2 представляет собой A, а X3 представляет собой F (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) и SEQ ID NO:44, где X1 представляет собой N (VL CDR3). В одном конкретном воплощении антигенсвязывающая область содержит CDR, показанные в SEQ ID NO:40, где X1 представляет собой S (VH CDR1), SEQ ID NO:41, где X1 представляет собой R, X2 представляет собой K, X3 представляет собой T (VH CDR2), SEQ ID NO:42, где X1 представляет собой A, X2 представляет собой D, а X3 представляет собой V (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) и SEQ ID NO:44, где X1 представляет собой S (VL CDR3). В одном конкретном воплощении антигенсвязывающая область содержит CDRs, показанные в SEQ ID NO:40, где X1 представляет собой R (VH CDR1), SEQ ID NO:41, где X1 представляет собой V, X2 представляет собой K, X3 представляет собой V (VH CDR2), SEQ ID NO:42, где X1 представляет собой T, X2 представляет собой A, а X3 представляет собой F (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) и SEQ ID NO:44, где X1 представляет собой N (VL CDR3).

Аминокислотные замены могут, например, представлять собой консервативные аминокислотные замены, как указано в другом разделе настоящего описания.

В частности, для воплощений, в которых последовательности VH- и/или VL-области отличаются от последовательностей антитела С, рассматриваются антитела, в которых аминокислотные последовательности VH- и/или VL-области отличаются от последовательностей антитела С только в одной или нескольких аминокислотных последовательностях каркасной области (FR). В таких воплощениях антитело сохраняет последовательности CDR VH, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, и последовательности CDR VL, представленные в SEQ ID NO:6, AAS и SEQ ID NO:7.

Соответственно, в некоторых воплощениях антигенсвязывающий участок может содержать VH-область, включающую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4, и VL-область, включающую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, где VH-область имеет по меньшей мере 80% идентичности SEQ ID NO:1, а VL-область имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO:5.

В одном конкретном воплощении антитело содержит

- VH-область, включающую SEQ ID NO:1 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, на 90%, или 95%, или

97%, или 98%, или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1; и/или

- VL-область, включающую SEQ ID NO:5 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, на 90%, или 95%, или 97%, или 98%, или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:5.

В другом конкретном воплощении в антителе

- VH отличается от SEQ ID NO:1 на 12 или менее, например, на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, такие как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков; и/или

- VL отличается от SEQ ID NO:5 на 12 или менее, например, на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутации(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.

В конкретном воплощении антитело содержит

- тяжелую цепь, включающую VH-область, включающую SEQ ID NO:1, и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и

- легкую цепь, включающую VL, включающую SEQ ID NO:5.

В другом конкретном воплощении антитело представляет собой полноразмерное двухвалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где

- каждая тяжелая цепь содержит VH-область и CH-область, где VH-область содержит SEQ ID NO:1, а CH-область содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и

- каждая легкая цепь содержит VL-область и CL-область, где VL-область содержит SEQ ID NO:5, а CL-область содержит SEQ ID NO:37.

*Fc-область и CH-область*

Мутации в аминокислотных остатках в положениях, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, могут улучшить способность антитела индуцировать КЗЦ (см., например, Пример 3). Без привязки к теории, подразумевается, что путем замены одной или нескольких аминокислот в этих положениях можно стимулировать олигомеризацию антитела, тем самым модулируя эффекторные функции, например, повышая связывание C1q, активацию комплемента, КЗЦ, АКФ, интернализацию или другие соответствующие функции, которые могут обеспечить эффективность *in vivo*.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит антитело, содержащее Fc-область или CH-область IgG1 человека, включающую мутацию в одном

или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU. В дальнейшем ссылка на мутацию(ии) в Fc-области может аналогичным образом применяться к мутации(ям) в области CH IgG1 человека и наоборот.

Как описано в настоящей заявке, положение аминокислоты, подлежащей мутации, в Fc-области или CH-области IgG1 человека может быть указано относительно (т.е. «соответствует») ее положению во встречающейся в природе («дикий тип») тяжелой цепи человеческого IgG1, при нумерации по индексу EU. Таким образом, если Fc-область уже содержит одну или несколько мутаций и/или если Fc-область представляет собой, например, Fc-область IgG2, IgG3 или IgG4, положение аминокислоты, соответствующей аминокислотному остатку, такому как, например, E430 в тяжелой цепи IgG1 человека, пронумерованной в соответствии с индексом EU, можно определить путем выравнивания. В частности, Fc-область выравнивают с последовательностью тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа, чтобы идентифицировать остаток в положении, соответствующем E430 в последовательности тяжелой цепи IgG1 человека. Для этой цели можно использовать любую аминокислотную последовательность константной области человеческого IgG1 дикого типа, включая любой из различных аллотипов IgG1 человека, представленных в таблице 1. Это показано на фиг. 1, где показано выравнивание между двумя разными аллотипами IgG1 человека - IgG1m(f) и IgG1m(a) - и человеческими IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа, особенно сегментов, соответствующих остаткам P247-K447 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

Соответственно, в остальных абзацах этого раздела и в других разделах настоящего описания, если иное не указано или это не противоречит контексту, указанные положения аминокислот представляют собой положения, соответствующие аминокислотным остаткам в тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

В отдельных и конкретных воплощениях Fc-область и/или CH-область IgG1 человека содержит мутацию только в одном из аминокислотных остатков E430, E345 и S440; как в E430, так и в E345; как в E430, так и в S440; как в E345, так и в S440; или во всех остатках E430, E345 и S440. В некоторых воплощениях Fc-область и/или CH-область IgG1 человека содержит мутацию только в одном из аминокислотных остатков E430, E345 и S440; как в E430, так и в E345; как в E430, так и в S440; как в E345, так и в S440; или во всех остатках E430, E345 и S440, при условии, что любая мутация в S440 представляет собой S440W или S440Y. В других отдельных и конкретных воплощениях мутация

представляет собой замену аминокислоты. В одном воплощении мутация представляет собой аминокислотную замену только в одном из аминокислотных остатков E430X, E345X и S440X; как в E430X, так и в E345X; как в E430X, так и в S440X; как в E345X, так и в S440X; или во всех остатках E430X, E345X и S440X, предпочтительно при условии, что любая мутация в S440X представляет собой S440Y или S440W. Более предпочтительно мутации E430X, E345X и S440X выбирают по отдельности из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.

В некоторых воплощениях в антители мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках выбрана из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.

В одном воплощении в антители мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках выбрана из группы, соответствующей E430G, E345K, E430S и E345Q.

В одном воплощении мутация находится в аминокислотном остатке, соответствующем E430, например, аминокислотная замена E430X, например, выбранная из тех, которые соответствуют E430G, E430S, E430F или E430T. В одном предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает E430G. В другом предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает E430S, при этом необязательно не происходит никаких мутаций в аминокислотных остатках, соответствующих E345 и S440. В конкретном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает или состоит из E430G. В особенно предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках состоит из E430G, т.е. в аминокислотных остатках, соответствующих E345 и S440, не производится никаких мутаций.

В одном воплощении мутация находится в аминокислотном остатке, соответствующем E345, например, аминокислотная замена E345X, например, выбранная из тех, которые соответствуют E345K, E345Q, E345R и E345Y. В одном предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает E345K. В другом предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает E345Q, при этом необязательно не происходит никаких мутаций в аминокислотных остатках, соответствующих E430 и S440. В особенно предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках состоит из E345K, т.е. в аминокислотных остатках, соответствующих E430 и S440, не производится никаких мутаций.

В одном воплощении мутация находится в аминокислотном остатке,

соответствующем S440, например, аминокислотная замена S440X, обычно выбранная из тех, которые соответствуют S440Y и S440W. В одном предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает S440W, необязательно, при этом в аминокислотных остатках, соответствующих E430 и E345, не производится никаких мутаций. В одном предпочтительном воплощении мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает S440Y, при этом необязательно не производится никаких мутаций в аминокислотных остатках, соответствующих E430 и E345.

Предпочтительно Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, при нумерации в соответствии с индексом EU, представляет собой, за исключением какой-либо указанной мутации, Fc-область IgG человека, выбранную из группы, состоящей из Fc-областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Предпочтительно Fc-область, за исключением какой-либо указанной мутации(ий), представляет собой встречающуюся в природе («дикий тип») Fc-область IgG человека, такую как Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека дикого типа, или Fc-область их смешанного изоформа. В одном воплощении Fc-область и/или CH-область IgG1 человека, за исключением какой-либо указанной мутации(ий), представляет собой изоформа человеческого IgG1 дикого типа.

Таким образом, Fc-область или CH-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, может, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий)(ий), быть изоформой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, или их смешанным изоформой. В одном воплощении Fc-область или CH-область, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), представляет собой Fc-область IgG1 человека.

В конкретном воплощении Fc-область и/или CH-область IgG1 человека, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, за исключением какой-либо указанной мутации, представляет собой человеческий изоформа IgG1m(f), IgG1m(z), IgG1m(a) или IgG1m(x) дикого типа. В конкретном воплощении Fc-область и/или CH-область IgG1 человека представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), человеческий IgG1 дикого типа смешанного аллотипа, такой как IgG1m(za), IgG1m(zax), IgG1m (фа) или т.п. В конкретном воплощении Fc-область и/или CH-область IgG1 человека, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий) (ий), представляет собой изоформа человеческого IgG1m(za) дикого типа.

Таким образом, Fc-область и/или CH-область IgG1 человека, содержащая мутацию



в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, может, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), быть человеческим аллотипом IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(z) или смешанным аллотипом любых двух или более из них.

Аминокислотные последовательности области CH конкретных примеров изоформ человеческого IgG дикого типа и аллотипов IgG1 представлены в таблице 1. В некоторых воплощениях Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, содержит, за исключением любой указанной мутации, CH2-CH3 или, необязательно, сегменты шарнир-CH2-CH3 таких аминокислотных последовательностей области CH дикого типа.

В конкретном воплощении Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой, за исключением какой-либо указанной мутации, изоформ IgG1 человека дикого типа, содержащий аминокислотные остатки, соответствующие 231-447 или 231-446 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU. Например, Fc-область может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), аминокислотные остатки со 114 по 330 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23. В конкретном воплощении Fc-область представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), изоформ IgG1 человека дикого типа, содержащий аминокислотные остатки, соответствующие 216-447 в тяжелой цепи IgG1 человека в соответствии с нумерацией EU. Например, Fc-область может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), аминокислотные остатки со 99 по 330 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23. Как раскрыто в других разделах настоящего описания, для получения терапевтических антител C-концевая аминокислота K447 иногда может быть делетирована (т.е. отсутствовать) или удалена. Следовательно, Fc-область может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), аминокислотные остатки с 114 по 329 (прямая нумерация) или аминокислотные остатки с 99 по 329 (прямая нумерация) из SEQ ID NO: 45.

В конкретном воплощении Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой, за исключением какой-либо указанной мутации, изоформ IgG1 человека дикого типа, содержащий аминокислотные остатки,

соответствующие 231-447 или 231-446 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU. Например, Fc-область может содержать аминокислотные остатки со 114 по 330 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:33. В другом воплощении Fc-область может содержать аминокислотные остатки со 114 по 329 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 и SEQ ID NO: 46. В еще одном воплощении Fc-область может содержать аминокислотные остатки с 114 по 329 (прямая нумерация) SEQ ID NO: 46.

В конкретном воплощении Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой, за исключением какой-либо указанной мутации, изотип IgG1 человека дикого типа, содержащий аминокислотные остатки, соответствующие 216-447 или 216-446 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU. Например, Fc-область может содержать аминокислотные остатки с 99 по 330 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27., SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:33. В другом воплощении Fc-область может содержать аминокислотные остатки с 99 по 329 (прямая нумерация) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 и SEQ ID NO:46. В еще одном воплощении Fc-область может содержать аминокислотные остатки с 99 по 329 (прямая нумерация) SEQ ID NO: 46.

Таким образом, настоящее изобретение можно применять к молекулам антител, содержащим тяжелую цепь IgG1 человека, такую как тяжелая цепь IgG1 человека, содержащая аминокислотную последовательность CH-области IgG1 человека, включающую SEQ ID NO:19 (IgGm(za)). Таким образом, CH-область IgG1 человека может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий)(ий), последовательность SEQ ID NO:19.

Настоящее изобретение также можно применять к молекулам антител, содержащим тяжелую цепь IgG1 человека, такую как тяжелая цепь IgG1 человека, содержащая аминокислотную последовательность CH-области IgG1 человека, включающую SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) или SEQ ID NO: 45. Таким образом, CH-область IgG1 человека может

содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий)(ей), последовательность SEQ ID NO:20. В другом воплощении СН-область IgG1 человека может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий)(ей), последовательность SEQ ID NO: 45.

Настоящее изобретение также можно применять к молекулам антител, содержащим тяжелую цепь IgG1 человека, такую как тяжелая цепь IgG1 человека, содержащая аминокислотную последовательность СН-области IgG1 человека, включающую SEQ ID NO:21 (IgGm(z)). Таким образом, СН-область IgG1 человека может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), последовательность SEQ ID NO:21.

Настоящее изобретение также можно применять к молекулам антител, содержащим тяжелую цепь IgG1 человека, такую как тяжелая цепь IgG1 человека, содержащая аминокислотную последовательность СН-области IgG1 человека, включающую SEQ ID NO:22 (IgGm(a)). Таким образом, СН-область IgG1 человека может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), последовательность SEQ ID NO:22.

Настоящее изобретение также можно применять к молекулам антител, имеющим тяжелую цепь IgG1 человека, такую как тяжелая цепь IgG1 человека, содержащая аминокислотную последовательность СН-области IgG1 человека, включающую SEQ ID NO:23 (IgGm(x)). Таким образом, СН-область IgG1 человека может содержать, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), последовательность SEQ ID NO:23.

В одном воплощении СН-область IgG1 человека содержит, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), последовательность SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO :23 или SEQ ID NO:45.

В других отдельных и конкретных воплощениях СН-область IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 46.

В конкретном воплощении СН-область IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 24 (IgG1m(f)-E430G) или SEQ ID NO: 46 (IgG1m(f)-E430G, без K447), необязательно, где легкая цепь содержит CL содержащий SEQ ID NO:37.

В конкретном воплощении антитело представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее две HC, идентичные по аминокислотной последовательности, и две LC, идентичные по аминокислотной последовательности.

Однако Fc-области или СН-области IgG1 человека, содержащие одну или несколько дополнительных мутаций, то есть мутации в одном или нескольких других аминокислотных остатках, отличных от тех, которые соответствуют E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, при нумерации в соответствии с индексом EU, также

рассматриваются для раскрытых в настоящей заявке антител. Так, в одном воплощении Fc-область или CH-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440, содержит также одну или несколько дополнительных мутаций в аминокислотных остатках, отличных от тех, которые соответствуют E430, E345 и S440, в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU. Также или в качестве альтернативы Fc-область может представлять собой смешанный изотип, например, когда разные области CH происходят от разных изотипов IgG. Соответственно, как более подробно описано ниже, в дополнение к мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440, Fc-область может содержать одну или несколько дополнительных мутаций по сравнению с диким типом (встречающимся в природе) или смешанным изотипом Fc-области человеческого IgG.

В одном воплощении Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440, представляет собой Fc-область IgG человека, которая содержит одну или несколько дополнительных мутаций по сравнению с Fc-областью человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа, например, как указано в одной из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 и SEQ ID NO:36. Экспрессированная альтернативным образом Fc-область, содержащая мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440, может также отличаться одной или несколькими дополнительными мутациями от Fc-области человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа, например, как указано в одной из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 и SEQ ID NO:36. Например, в дополнение к мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440, Fc-область может отличаться от Fc-области дикого типа на 12 или менее, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.

Например, С-концевая аминокислота Lys (K) в положении 447 (нумерация Eu) может отсутствовать. Некоторые клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела, могут содержать ферменты, способные удалять Lys в положении 447, и такое удаление может быть неоднородным. Таким образом, терапевтические антитела могут быть получены без С-концевого Lys (K) для повышения гомогенности продукта. Способы получения антител без С-концевого Lys (K) хорошо известны специалистам в данной области и включают генную инженерию нуклеиновой кислоты, экспрессирующей

указанное антитело, ферментативные методы и использование специфических клеток-хозяев. Так, например, Fc-область может содержать, за исключением мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках, соответствующих E430, E345 и S440, последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45, так что антитело экспрессируется из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь без остатка K447.

Предпочтительно любая такая одна или несколько дополнительных мутаций не снижают способность антитела, как описано в настоящем документе, т.е. антитело, содержащее мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи из IgG1 человека, чтобы индуцировать КЗЦ и/или АЗКЦ. Более предпочтительно, любая такая одна или несколько дополнительных мутаций не снижают способность антитела индуцировать КЗЦ. То есть антитело, содержащее Fc-область, включающую одну или несколько дополнительных мутаций, не имеет уменьшенных КЗЦ и/или АЗКЦ по сравнению с антителом без одной или нескольких дополнительных мутаций. Наиболее предпочтительно любая такая одна или несколько дополнительных мутаций не снижают способность антитела индуцировать КЗЦ или АЗКЦ. Кандидаты на одну или несколько дополнительных мутаций можно, например, протестировать в анализах КЗЦ или АЗКЦ, например, как описано в настоящей заявке, например, в примерах 3 и 4. В частности, КЗЦ антитела, как раскрыто в настоящем описании, например, IgG1-C-E430G, можно протестировать в анализе примера 3 или анализе, описанном в следующем разделе (или аналогичном анализе), с использованием или без специфических кандидатов на одну или нескольких дополнительных мутаций, чтобы установить влияние дополнительных мутаций-кандидатов на способность антитела индуцировать КЗЦ. Аналогично, АЗКЦ антитела, раскрытые в настоящем описании, например, IgG1-C-E430G, можно протестировать в анализе примера 4 или анализе, описанном в следующем разделе (или аналогичном анализе), с использованием или без специфических кандидатов на одну или нескольких дополнительных мутаций, чтобы установить влияние дополнительной мутации-кандидата на способность антитела индуцировать АЗКЦ.

Предпочтительно в антителе, содержащем две HC и две LC, Fc-области в первой и второй HC идентичны по аминокислотной последовательности, так что Fc-область в димеризованной форме представляет собой гомодимер.

Однако в некоторых воплощениях в антителе, содержащем две HC и две LC, Fc-область в первой HC может отличаться одной или несколькими аминокислотами от Fc-области во второй HC, так что Fc-область в димеризованной форме, является гетеродимером. Например, мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках,

выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, может присутствовать только в одной из Fc-области. Соответственно, в некоторых воплощениях одна Fc-область может представлять собой SEQ ID NO:45 или Fc-область IgG дикого типа человека, выбранную из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, в то время как другая Fc-область может быть идентичной, за исключением мутации в указанном одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека.

В одном воплощении антитело согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), представляет собой человеческое антитело.

В одном случае антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело человека.

В одном случае антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), двухвалентное антитело, такое как двухвалентное антитело человека, такое как двухвалентное полноразмерное антитело человека.

В одном случае антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), моноклональное антитело, такое как человеческое моноклональное антитело, такое как человеческое бивалентное моноклональное антитело, такое как человеческое двухвалентное полноразмерное моноклональное антитело.

В предпочтительном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), антитело IgG1, такое как полноразмерное антитело IgG1, такое как полноразмерное антитело IgG1 человека, необязательно человеческое моноклональное полноразмерное двухвалентное антитело IgG1,к, например, человеческое моноклональное полноразмерное двухвалентное антитело IgG1m(f),к.

Антитело по настоящему изобретению преимущественно находится в двухвалентном моноспецифическом формате, содержащем два антигенсвязывающих участка, связывающихся с одним и тем же эпитопом. Однако также рассматриваются биспецифические форматы, в которых один из антигенсвязывающих участков связывается с другим эпитопом. Таким образом, антитело в соответствии с любым аспектом или

воплощением настоящего изобретения может, если это не противоречит контексту, быть либо моноспецифическим антителом, либо биспецифическим антителом.

В одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой моноспецифическое антитело, такое как человеческое моноспецифическое антитело, такое как человеческое полноразмерное моноспецифическое антитело, такое как человеческое полноразмерное моноспецифическое двухвалентное моноклональное антитело. Необязательно, за исключением любой указанной мутации, антитело может представлять собой полноразмерное моноспецифическое двухвалентное моноклональное антитело IgG1к человека, например, моноклональное полноразмерное моноклональное антитело IgG1m(f) к человека.

В другом варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения представляет собой полиспецифическое антитело, такое как полноразмерное биспецифическое бивалентное антитело, такое как человеческое биспецифическое полноразмерное двухвалентное антитело, такое как человеческое полноразмерное биспецифическое бивалентное моноклональное антитело. Необязательно, за исключением любой(ых) указанной(ых) мутации(ий), антитело может представлять собой полноразмерное биспецифическое бивалентное моноклональное антитело IgG1к человека, например, человеческое полноразмерное биспецифическое бивалентное IgG1m(f)к моноклональное антитело.

В конкретном случае фармацевтическая композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения содержит антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из двух идентичных аминокислотных последовательностей тяжелой цепи (HC) и двух идентичных аминокислотных последовательностей легкой цепи (LC), где аминокислотная последовательность каждой HC содержит VH-область, включающую SEQ ID NO:1, и CH-область, включающую SEQ ID NO:46, и где каждая аминокислотная последовательность LC содержит VL-область, включающую SEQ ID NO:5, и CL-область, включающую SEQ ID NO: 37.

#### *Модуляция функций*

Антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения может связываться с CD38 человека и, как правило, индуцировать одну или несколько реакций (предпочтительно все) КЗЦ, АЗКЦ, АКФ, апоптоз в присутствии, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего агента, тромбоцитоз или любую их комбинацию, в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих человеческий CD38, обычно в присутствии комплемента и эффекторных клеток. Антитело в соответствии с

любым аспектом или воплощением настоящего изобретения также обычно способно модулировать ферментативную активность CD38.

Соответственно, в одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения может индуцировать одну или более реакцию из КЗЦ, АЗКЦ, АКФ, апоптоза в присутствии, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего агента, трогоцитоза и модулирования ферментативной активности CD38 или любой их комбинации.

В одном воплощении антитело способно связываться с His-меченным CD38 человека с последовательностью SEQ ID NO: 39.

В одном воплощении антитело оказывает ингибирующее действие на циклазную активность человеческого CD38. Например, антитело может ингибировать циклазную активность CD38 человека по меньшей мере на около 40%, например, по меньшей мере на около 50%, например, по меньшей мере на около 60%. Ингибирование активности циклазы можно определить с помощью анализа, включающего следующие стадии:

- a) посев 200 000 клеток Daudi или Wien133 в 100 мкл 20 mM Tris-HCL на лунку; или добавление 0,6 мкг/мл His-меченного растворимого CD38 человека (SEQ ID NO:39) в 100 мкл 20 mM Трис-HCL на лунку в многолуночный планшет;
- b) добавление 1 мкг/мл CD38-антитела и 80 мкМ NGD в каждую лунку;
- c) измерение флуоресценции до достижения плато (например, 5, 10 или 30 минут); и
- d) определение процентного ингибирования по сравнению с контролем, например, в лунке, инкубированной с контрольным изотипическим антителом.

В одном воплощении антитело индуцирует апоптоз в присутствии, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего антитела.

В одном воплощении антитело индуцирует КЗЦ, АЗКЦ, антителозависимый клеточный фагоцитоз (АКФ), трогоцитоз или любую их комбинацию клеток, экспрессирующих человеческий CD38.

В одном воплощении антитело индуцирует КЗЦ клеток, экспрессирующих человеческий CD38. Например, антитело может индуцировать КЗЦ против клеток Daudi (ATCC No. CCL-213) или клеток Ramos (ATCC No. CRL-1596), что приводит к максимальному лизису по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% выше, чем у референсного антитела, отличающегося только отсутствием одной или нескольких мутаций в Fc-области. КЗЦ можно определить с помощью анализа, включающего следующие стадии:

- a) посев 100 000 CD38-экспрессирующих клеток в 40 мкл культуральной среды



с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;

b) предварительная инкубация клеток в течение 20 минут с 40 мкл серийно разбавленного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);

c) инкубация каждой лунки в течение 45 минут при 37°C с 20% объединенной нормальной человеческой сывороткой;

d) добавление красителя для оценки жизнеспособности и измерение процента лизиса клеток на проточном цитометре; и

e) определение максимального лизиса с помощью нелинейной регрессии.

Более подробные воплощения в отношении модуляции функции описаны ниже.

#### Комплементзависимая цитотоксичность (CDC)

В одном воплощении антитело, как раскрыто в настоящем описании, индуцирует КЗЦ. В частности, антитело может опосредовать повышенную КЗЦ при связывании с CD38, например, на поверхности CD38-экспрессирующей клетки или клеточной мембраны по сравнению с контролем. Контролем может быть, например, референсное антитело с аминокислотными последовательностями (как правило, аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепей), идентичными таковым антитела по изобретению, за исключением мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека антитела по изобретению. Альтернативно, контроль может представлять собой референсное антитело с аминокислотными последовательностями (как правило, аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепей), идентичными таковым антитела по изобретению, за исключением различий в последовательностях VH и VL. Такое референсное антитело может, например, иметь последовательности VH и VL антитела В или А, как показано в таблице 1. Предпочтительно последовательности VH и VL референсного антитела являются последовательностями антитела В. Альтернативно, референсное антитело может представлять собой антитело, связывающееся с той же самой мишенью, но имеющее другие аминокислотные последовательности. В качестве альтернативы, контроль может представлять собой изотипическое контрольное антитело, например, такое, в котором последовательности VH и VL являются последовательностями антитела b12, как показано в таблице 1.

Соответственно, в одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует более высокую КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела С, т.е. SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей референсного

антитела идентичны таковым антитела по изобретению, за исключением одной или нескольких мутаций в E430, E345 и/или S440 антитела по изобретению.

В другом варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует более высокую КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела C, т.е. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO:5, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей из SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) и SEQ ID NO:37 (каппа), соответственно.

В другом варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует более высокую КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела B, т.е. SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO:9, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей референсного антитела идентичны таковым антитела по изобретению.

В другом варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокую КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела A, т.е. SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO:11, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей референсного антитела идентичны таковым антитела по изобретению.

В другом варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует более высокую КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO:16, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению.

В одном конкретном воплощении ответ на КЗЦ описывается как максимальный лизис, где более высокий максимальный лизис отражает повышенную КЗЦ. В одном конкретном воплощении реакция КЗЦ описывается как EC50 (концентрация, при которой наблюдается полумаксимальный лизис), где более низкая EC50 указывает на повышенную КЗЦ. В одном конкретном воплощении клетки-мишени, экспрессирующие CD38, представляют собой опухолевые клетки, такие как клетки лимфомы. Неограничивающие примеры клеток-мишеней лимфомы включают (в скобках указан коммерческий источник):

- клетки Daudi (ATCC CCL-213);

- клетки Ramos (ATCC CRL-1596);
- клетки REH (DSMZ ACC 22);
- клетки Wien-133 (BioAnaLab, Оксфорд, Великобритания);
- клетки PC4;11 (DSMZ ACC 508);
- NALM-16 (DSMZ ACC 680);
- U266 (ATCC TIB-196);
- RC-K8 (DSMZ ACC 561);
- SU-DHL-8;
- Oci-Ly-7;
- Oci-Ly-19;
- Oci-Ly-18;
- Raji;
- DOKH-2;
- SU-DHL-4;
- WSU-DLCL-2;
- Z-138;
- JVM-13;
- Jeko-1;
- 697;
- Granta 519;
- DB;
- Pfeiffer.

Клетки-мишени, экспрессирующие CD38, также могут быть клетками AML, такими как клетки, выбранные из группы, состоящей, помимо прочего, из: THP1, monomac6, Oci-AML3, KG-1, ML2, U937, Nomo-1, AML-193, MEGAL, MOLM13, HL-60, Oci-M1.

Клетки-мишени, экспрессирующие CD38, также могут быть клетками MM, такими как клетки, выбранные из группы, состоящей из, без ограничения указанным: LP-1, NCI-H929, OPM-2 и ARH77.

В другом конкретном воплощении клетки-мишени, экспрессирующие CD38, представляют собой опухолевые клетки, такие как клетки лимфомы, клетки лейкоза или клетки миеломы, где приблизительное среднее количество молекул CD38 на клетку находится в одном из следующих диапазонов, необязательно при определении, как описано в Пример 1:

- 150000-250000, например, около 200000;

- 200000-300000, например, около 260000;
- 80000-180000, например, около 130000;
- 50000-150000, например, около 100000;
- 40000-120000, например, около 80000;
- 30000-70000, например, около 50000;
- 10000-20000, например, около 15000;
- 5000-15000, например, около 10000.

В одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, как раскрыто в настоящем описании, индуцирует повышенную КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, по сравнению с референсным антителом, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела В, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению, где КЗЦ-ответ представляет собой EC50, а CD38-экспрессирующие клетки-мишени выбраны из NALM-16 (DSMZ ACC 680), U266 (ATCC TIB-196) и RC-K8 (DSMZ ACC 561).

В предпочтительном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует повышенную КЗЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, по сравнению с референсным антителом, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела С, т.е. SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) и SEQ ID NO:37 (каппа), соответственно, где КЗЦ-ответ представляет собой максимальный лизис, и клетки-мишени, экспрессирующие CD38, выбраны из клеток Daudi (ATCC CCL-213) и клеток Ramos (ATCC CRL-1596). В частности, антитело по изобретению может приводить к максимальному лизису по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 70% выше, чем у референсного антитела.

Можно использовать любой способ или анализ *in vitro* или *in vivo*, известный специалисту и подходящий для оценки способности антитела, такого как IgG-антитело, индуцировать АКФ против CD38-экспрессирующих клеток-мишеней. Предпочтительно анализ включает в соответствующей части стадии анализа КЗЦ, описанные в Примере 3.

Неограничивающий пример анализа для определения максимального лизиса клеток, экспрессирующих CD38, опосредованного CD38-антителом или значения EC50 может включать следующие стадии:

- (а) посев около 100 000 CD38-экспрессирующих клеток в 40 мкл культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;

- (b) предварительная инкубация клеток в течение 20 минут с 40 мкл серийно разведенного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);
- (c) инкубация каждой лунки в течение 45 минут при 37°C с 20% объединенной нормальной человеческой сывороткой;
- (d) добавление красителя для оценки жизнеспособности и измерение процента лизиса клеток на проточном цитометре;
- (e) определение максимального лизиса и/или расчет значения EC50 с использованием нелинейной регрессии.

Опухолевые клетки, подходящие для этого анализа, включают, без ограничений, клетки, перечисленные в таблице 2, такие как клетки Daudi (ATCC CCL-213).

В некоторых воплощениях антитело индуцирует КЗЦ против клеток Daudi (ATCC No. CCL-213) или клеток Ramos (ATCC No. CRL-1596), что приводит к максимальному лизису не менее чем на 50%, например, не менее чем на 60%, например, не менее чем на 70% выше, чем у референсного антитела, отличающегося только отсутствием мутации в одном или нескольких аминокислотных остатках выбран из группы, соответствующей E430, E435 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU. В одном воплощении референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела C, т.е. SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) и SEQ ID NO: 37 (каппа), соответственно.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ):

В одном варианте антитело согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения индуцирует АЗКЦ. В некоторых воплощениях антитело может опосредовать АЗКЦ при связывании с CD38, например, на поверхности CD38-экспрессирующей клетки или клеточной мембраны. Было обнаружено, что анти-CD38 антитела, содержащие мутацию E430G, индуцируют несколько более низкие уровни АЗКЦ по сравнению с тем же антителом без мутации E430G. Антитело может опосредовать более высокую АЗКЦ при связывании с CD38, например, на поверхности CD38-экспрессирующей клетки или клеточной мембраны, чем контроль, где контроль может быть, например, референсным антителом с аминокислотными последовательностями (обычно аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепей), идентичными антителу по изобретению, за исключением различий в последовательностях VH и VL. Такое референсное антитело может, например, иметь последовательности VH и VL антитела B или A, как показано в таблице 1. Предпочтительно последовательности VH и VL референсного антитела являются последовательностями антитела B. В качестве альтернативы, контроль может

представлять собой изотипическое контрольное антитело, например, такое, в котором последовательности VH и VL являются последовательностями антитела b12, как показано в таблице 1.

Соответственно, в одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокую АЗКЦ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела B, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению. В одном конкретном воплощении ответ на АЗКЦ представляет собой максимальный лизис, где более высокий максимальный лизис отражает более высокую АЗКЦ. В одном конкретном воплощении ответ на АЗКЦ оценивают в анализе, определяющем связывание FcγRIIIa, где более высокое связывание указывает на более высокую АЗКЦ. В одном конкретном воплощении клетки-мишени, экспрессирующие CD38, представляют собой опухолевые клетки. Неограничивающие примеры клеток-мишеней включают Daudi, Wien-133, Granta 519, MEC-2 и линии опухолевых клеток, перечисленные в таблице 2.

В одном воплощении антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокую АЗКЦ против клеток Daudi, экспрессирующих CD38, по сравнению с референсным антителом, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные антителу, необязательно, где ответ АЗКЦ представляет собой максимальный лизис или связывание FcγRIIIa.

В одном воплощении антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокую АЗКЦ против клеток Daudi, экспрессирующих CD38, по сравнению с референсным антителом, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:16, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению, необязательно, где ответ на АЗКЦ представляет собой максимальный лизис или связывание FcγRIIIa.

Можно использовать любой способ или анализ *in vitro* или *in vivo*, известный специалисту в данной области и подходящий для оценки способности антитела, такого как IgG-антитело, индуцировать АЗКЦ против CD38-экспрессирующих клеток-мишеней. Предпочтительно анализ включает, в соответствующей части, стадии анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности с высвобождением <sup>51</sup>Cr или репортерного

биоанализа АЗКЦ, описанного в Примере 4. Неограничивающие примеры анализов для определения АЗКЦ по отношению к CD38-экспрессирующим клеткам, опосредованной CD38-антителом, могут включать стадии анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  или репортерного анализа, изложенные ниже.

Анализ АЗКЦ с высвобождением  $^{51}\text{Cr}$ :

(a) посев около 5000 меченных  $^{51}\text{Cr}$  CD38-экспрессирующих клеток (например, клеток Daudi) в 50 мкл культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;

(b) предварительная инкубация клеток в течение 15 минут с 50 мкл серийно разведенного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);

(c) инкубация каждой лунки в течение 4 часов при 37°C с 500 000 свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) на лунку;

(d) измерение количества высвободившегося  $^{51}\text{Cr}$  в 75 мкл надосадочной жидкости на гамма-счетчике;

(e) вычисление процента лизиса клеток как (количество импульсов в минуту – спонтанный лизис клеток в минуту)/(максимальный лизис числа импульсов в минуту – спонтанный лизис клеток в минуту), где количество импульсов в минуту – количество импульсов в минуту.

Репортерный анализ АЗКЦ:

(a) посев около 5000 клеток Daudi в 10 мкл в лунки многолуночного планшета, подходящего для оптических измерений (например, 384-луночные планшеты OptiPlate от PerkinElmer Inc.) в стандартной среде (например, RPMI 1640), дополненной 25% сывороткой с низким содержанием IgG;

(b) инкубация каждой лунки в течение 6 часов при 37°C с 10 мкл сконструированных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток, и 10 мкл серийно разведенных антител CD38 (0,0002- 10 мкг/мл);

(c) инкубация каждой лунки в течение 5 минут при комнатной температуре с 30 мкл субстрата люциферазы и измерение люминесценции.

Антителозависимый клеточный фагоцитоз (АКФ):

В одном варианте антитело согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения индуцирует АКФ. В некоторых воплощениях антитело может опосредовать АКФ при связывании с CD38, например, на поверхности CD38-экспрессирующей клетки или клеточной мембраны. Антитело может опосредовать более высокий АКФ при

связывании с CD38, например, на поверхности CD38-экспрессирующей клетки или клеточной мембраны, чем контроль, где контроль представляет собой изотипическое контрольное антитело, например, такое, в котором последовательности VH и VL являются последовательностями антитела b12, как показано в таблице 1.

Соответственно, в одном случае антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, индуцирует более высокий АКФ против клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело отличается от антитела по изобретению только одной или несколькими мутациями в E430, E345 и/или S440 антитела по изобретению. В альтернативном воплощении референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:16, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению.

В одном конкретном воплощении клетки-мишени, экспрессирующие CD38, представляют собой опухолевые клетки, такие как клетки миеломы или лимфомы. Неограничивающие примеры клеток-мишеней, которые являются опухолевыми клетками, включают клетки, перечисленные в таблице 2.

Можно использовать любой способ или анализ *in vitro* или *in vivo*, известный специалисту и подходящий для оценки способности антитела, такого как IgG-антитело, индуцировать АКФ против CD38-экспрессирующих клеток-мишеней. Предпочтительно анализ включает в соответствующей части стадии анализа АКФ на основе макрофагов, описанного в Примере 5. В частности, анализ для определения АКФ по отношению к экспрессирующим CD38 клеткам, опосредованного CD38-антителом, может включать стадии, указанные ниже.

АКФ:

(a) дифференцировка свежевыделенных моноцитов в макрофаги при 5-дневной инкубации в среде, содержащей GM-CSF;

(b) посев примерно 100000 макрофагов на лунку в многолуночный планшет в среде дендритных клеток с GM-CSF;

(c) добавление 20 000 CD38-экспрессирующих клеток, опсонизированных CD38-антителами (например, клеток Daudi), меченных обычным флуоресцентным мембранным красителем, на лунку в течение 45 минут при 37°C;

(d) измерение процентного содержания CD14-положительных, CD19-отрицательных, положительных по мембранному красителю макрофагов на проточном цитометре.

Апоптоз:



Антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения может в одном варианте не индуцировать апоптоз в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего агента. В другом воплощении антитело может индуцировать апоптоз в присутствии Fc-перекрестно-связывающего агента, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего агента.

В одном воплощении Fc-перекрестно-связывающий агент представляет собой антитело.

В одном воплощении апоптоз можно определить, как описано в Примере 6.

Трогоцитоз:

В одном варианте антитело, как раскрыто в настоящем изобретении, индуцирует трогоцитоз, такой как трогоцитоз CD38 от донорских CD38-экспрессирующих клеток к акцепторным клеткам. Типичные акцепторные клетки включают Т- и В-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и NK-клетки. Предпочтительно акцепторные клетки представляют собой лимфоциты, экспрессирующие Fc-гамма-(Fc $\gamma$ )-рецепторы, такие как, например, макрофаги или РВМС. В частности, антитело может опосредовать повышенный трогоцитоз по сравнению с контролем. Контролем может быть, например, референсное антитело с аминокислотными последовательностями (как правило, аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепей), идентичными таковым антитела по изобретению, за исключением одной или нескольких мутаций в E430, E345 и/или S440 в антителе по изобретению. В другом воплощении контроль представляет собой референсное антитело с аминокислотными последовательностями (как правило, аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепей), идентичными таковым антитела по изобретению, за исключением различий в последовательностях VH и VL. Например, контроль может представлять собой изотипическое контрольное антитело, например, в котором последовательности VH и VL являются последовательностями антитела b12, как показано в таблице 1.

Подходящие анализы для оценки трогоцитоза известны в данной области и включают, например, анализ, приведенный в Примере 8. Неограничивающие примеры анализов для определения трогоцитоза CD38-экспрессирующих клеток, опосредованного CD38-антителом, включают следующее:

Трогоцитоз (клетки Daudi):

(a') дифференцировку свежевыделенных моноцитов в макрофаги с помощью GM-CSF в течение 5 дней;

(b') посев примерно 100 000 макрофагов на лунку в среду дендритных клеток с GM-CSF;

(c') добавление около 20 000 опсонизированных CD38-антителом клеток Daudi, меченных обычным флуоресцентным мембранным красителем, на лунку в течение 45 минут при 37°C;

(d') измерение экспрессии CD38 на клетках Daudi на проточном цитометре, где снижение CD38 на опсонизированных CD38-антителом клетках Daudi по сравнению с контролем указывает на трогоцитоз.

*Трогоцитоз (Treg):*

(a) посев около 500 000 свежесепарированных РВМС на лунку в среду для культивирования клеток в течение ночи при 37°C;

(b) добавление около 100 000 Treg, опсонизированных CD38-антителом, меченных универсальным флуоресцентным внутриклеточным аминовым красителем, на лунку в течение ночи (O/N) при 37°C; и

(c) измерение экспрессии CD38 на Treg на проточном цитометре, где снижение CD38 на опсонизированных CD38-антителом Treg по сравнению с контролем указывает на трогоцитоз.

В дополнение к клеткам Daudi (ATCC CCL-213) опухолевые клетки, подходящие для первого анализа, включают, без ограничения, клетки, перечисленные в таблице 2, в частности клетки с высокой экспрессией CD38. Кроме того, подходящие CD38-экспрессирующие клетки для второго анализа включают, помимо Treg, иммунные клетки, такие как, например, NK-клетки, В-клетки, Т-клетки и моноциты, а также опухолевые клетки, перечисленные в таблице 2, в частности клетки с низким уровнем экспрессии CD38.

Соответственно, в одном варианте антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокий уровень трогоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела С, т.е., SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению, за исключением одной или нескольких мутаций в E430, E345 и/или S440 антитела по изобретению.

В некоторых случаях антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует трогоцитоз клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, на более высоком уровне, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела В, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению.

В некоторых вариантах антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует трогоцитоз клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, на более высоком уровне, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела А, т.е. SEQ ID NO :10 и SEQ ID NO:11, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению.

В некоторых вариантах антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, индуцирует более высокий уровень трогоцитоза клеток-мишеней, экспрессирующих CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO :12 и SEQ ID NO:16, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению.

#### Модуляция ферментативной активности CD38:

Антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения обычно может модулировать одну или несколько ферментативных активностей человеческого CD38. В одном воплощении антитело, как раскрыто в настоящем описании, оказывает ингибирующее действие на активность циклазы CD38, например, по сравнению с контролем, например, изотипическим контрольным антителом, таким как антитело b12. Например, антитело может оказывать ингибирующее действие на циклазную активность CD38, экспрессируемую клеткой, такой как опухолевая клетка, и/или оказывать ингибирующее действие на выделенный CD38, такой как растворимый фрагмент CD38 (например, SEQ ID NO :39).

Можно использовать любой способ или анализ *in vitro* или *in vivo*, известный специалисту и подходящий для оценки способности анти-CD38 антитела ингибировать активность CD38-циклазы. Подходящие анализы для тестирования активности CD38-циклазы описаны, например, в WO 2006/099875 A1 и WO 2011/154453 A1. Предпочтительно способ включает, в соответствующей части, стадии конкретного анализа, раскрытого в Примере 6, тестирование активности циклазы с использованием натриевой соли никотинамидгуанидинуклеотида (NGD) в качестве субстрата для CD38. NGD, который не является флуоресцентным, циклизуется с помощью CD38 до флуоресцентного аналога cADPR, циклической GDP-рибозы (см., например, Comb, Chem High Throughput Screen. 2003 Jun;6(4):367-79A). Неограничивающий пример анализа включает следующие стадии определения ингибирования активности CD38-циклазы:

(a) посев 200 000 клеток Daudi или Wien133 в 100 мкл 20 mM Tris-HCL на лунку; или добавление 0,6 мкг/мл His-меченного растворимого CD38 (SEQ ID NO:39) в 100 мкл

20 mM Tris-HCL на лунку многолуночного планшета;

- (b) добавление 1 мкг/мл CD38-антитела и 80 мкМ NGD в каждую лунку;
- (c) измерение флуоресценции до достижения плато (например, 5, 10 или 30 минут); и
- (d) определение процентного ингибирования по сравнению с контролем, например, в лунке, инкубированной с контрольным изотипическим антителом.

В одном воплощении в таком анализе антитело способно ингибировать активность CD38-циклазы, в частности максимальный процент превращения NGD, по меньшей мере на около 40%, например, по меньшей мере на около 50%, например, по меньшей мере на около 60%, например, от около 40% до примерно 60%, по сравнению с контролем, обычно активностью CD38-циклазы в присутствии контрольного изотипического антитела. Например, изотипическое контрольное антитело может содержать последовательности VH- и VL-областей антитела b12, т.е. SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:16, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению. В конкретном воплощении в анализе используется hisCD38 (SEQ ID NO:39) для определения активности циклазы.

В некоторых вариантах антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, обладает повышенным (т.е. более эффективным) ингибированием активности CD38-циклазы по сравнению с референсным антителом, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела B, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению.

В некоторых вариантах антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем изобретении, обладает повышенным (т.е. более эффективным) ингибированием активности CD38-циклазы по сравнению с референсным антителом, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела A, т.е. SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно, и последовательности CH- и CL-областей, идентичные таковым антитела по изобретению.

Более того, в некоторых вариантах антитело, как описано в настоящем изобретении, индуцирует апоптоз клеток, экспрессирующих CD38, в присутствии, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающих антител. Обе эти функциональные возможности могут быть измерены в анализе, включающем, в соответствующей части, стадии анализа апоптоза, описанные в Примере 6. В одном воплощении анализ апоптоза может включать следующие стадии:

- (a) посев 100 000 опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, в 100 мкл

культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку;

(b) инкубация каждой лунки O/N при 37°C с серийно разведенным антителом CD38 (0,0002-10 мкг/мл) и 10 мкг/мл козьего антитела против IgG1 человека;

(c) измерение процента мертвых клеток на проточном цитометре.

Аффинность:

Способы оценки аффинности антитела, связывающегося с CD38, хорошо известны в данной области и могут быть использованы для оценки аффинности антитела, как описано в настоящей заявке. Особенно подходящим анализом для оценки аффинности связывания антитела, как описано в настоящей заявке, является анализ, раскрытый в Примере 13. Например, анализ Примера 13 можно использовать для определения аффинности антитела в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, по сравнению с референсным антителом. В некоторых воплощениях антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, имеет повышенную аффинность (т.е. более низкую KD) при связывании с CD38 человека, чем референсное антитело. В одном воплощении референсное антитело представляет собой IgG1-B. В другом воплощении референсное антитело представляет собой IgG1-C. В третьем воплощении референсное антитело представляет собой IgG1-A.

В некоторых воплощениях антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, имеет повышенную аффинность (т.е. более низкую KD) при связывании с CD38, чем референсное антитело, при этом референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела B, т.е. SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, и Fc-область IgG1, т.е. IgG1-B.

В некоторых воплощениях антитело в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании, представляет собой антитело, которое содержит VH, которая отличается от SEQ ID NO: 1 одной или несколькими мутациями, и/или содержит VL, которая отличается от SEQ ID NO: 5 на одну или более мутаций, и имеет повышенную аффинность (т.е. более низкую KD) при связывании с CD38, чем референсное антитело, где референсное антитело содержит последовательности VH- и VL-областей антитела C, т.е. SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно, а последовательности CH- и CL-областей идентичны таковым антитела по изобретению. В предпочтительном воплощении антитело содержит VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4, VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, так что одна или более

мутаций в VH и/или VL расположены в одной или нескольких областях FR.

### *Получение антител*

Антитело, раскрытое в настоящем описании, обычно продуцируется в клетке-хозяине, такой как рекомбинантная клетка-хозяин. В большинстве воплощений антитело будет содержать как тяжелую, так и легкую цепь, и поэтому клетка-хозяин обычно экспрессирует конструкцию, кодирующую как тяжелую, так и легкую цепь, либо в одном, либо в разных векторах. Клетка-хозяин может, например, содержать первую и вторую конструкции нуклеиновой кислоты, стабильно интегрированные в клеточный геном, где первая кодирует тяжелую цепь, а вторая кодирует легкую цепь антитела, как раскрыто в настоящем описании. В другом воплощении настоящее изобретение обеспечивает клетку, включающую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагемида или элемент линейной экспрессии, которая содержит первую и вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, как указано выше.

Соответственно, изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело, которое получено или может быть получено способом, включающим экспрессию тяжелой цепи и легкой цепи в клетке-хозяине. Линия клеток-хозяев, используемая для получения антитела, может влиять на профиль гликозилирования антитела, поскольку разные клетки-хозяева могут экспрессировать различный репертуар ферментов гликозилирования и транспортеров, что способствует специфичности и гетерогенности гликозилирования (Goh and Ng, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018;38:851-67).

Заявленная рекомбинантная клетка-хозяин может быть, например, эукариотической клеткой, прокариотической клеткой или микробной клеткой, например, трансфектомой. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. Другие примеры клеток-хозяев включают дрожжевые, бактериальные и растительные клетки. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6, NS0, клетка Sp2/0 или лимфоцитарная клетка. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

Клетка-хозяин может быть клеткой, которая способна к Asn-связанному гликозилированию белков, например, эукариотическая клетка, такая как клетка млекопитающего, например, клетка человека. Например, клеткой-хозяином может быть нечеловеческая клетка, которая генетически сконструирована для продукции гликопротеинов, имеющих гликозилирование, похожее на человеческое или человеческое

гликозилирование. Примерами таких клеток являются генетически модифицированные *Pichia pastoris* (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) и генетически модифицированные *Lemna minor* (Cox et al. др., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

Клетка-хозяин также может быть клеткой с измененным механизмом гликозилирования. Такие клетки были описаны в данной области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать антитела по изобретению, чтобы таким образом получить антитело с измененным гликозилированием. См. например, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, а также EP1176195; WO03/035835; и WO99/54342. Дополнительные способы получения сконструированных гликоформ известны в данной области и включают, без ограничения указанным, описанные в Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473), US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; Potelligent™ technology (Biowa, Inc. Принстон, Нью-Джерси); GlycoMAb™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Цюрих, Швейцария); US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49, а также то, что описано в WO2018/114877 WO2018/114878 и WO2018/114879.

Клеткой-хозяином также может быть клетка, которая не способна эффективно удалять С-концевые остатки лизина из тяжелых цепей антитела. Например, Таблица 2 в Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426 (включено в данное описание в качестве ссылки) перечисляет ряд таких систем продукции антител, например, Sp2/0, NS/0 или трансгенная молочная железа (коза), где достигается только частичное удаление С-концевого остатка лизина. Альтернативно, как описано в другом разделе настоящего описания, в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела, может отсутствовать кодон, кодирующий С-концевой лизин, например, остаток лизина, соответствующий K447 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислота остатки нумеруются в соответствии с индексом EU.

В конкретном воплощении фармацевтическая композиция по изобретению содержит полноразмерное двухвалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из

- тяжелой цепи, содержащей VH и CH, где VH содержит SEQ ID NO:1, а CH содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и
- и легкой цепи, содержащей VL и CL, где VL содержит SEQ ID NO:5, а CL содержит SEQ ID NO:37,

при этом антитело продуцируется в клетках яичника китайского хомяка (CHO).

В конкретном воплощении фармацевтическая композиция по изобретению содержит полноразмерное двухвалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из

- тяжелой цепи, содержащей VH и CH, где VH содержит SEQ ID NO:1, а CH содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и

- и легкой цепи, содержащей VL и CL, где VL содержит SEQ ID NO:5, а CL содержит SEQ ID NO:37,

где антитело получено или может быть получено способом, включающим экспрессию тяжелой цепи и легкой цепи в клетке CHO.

#### Терапевтические применения

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению имеют множество терапевтических применений, включая лечение заболеваний и нарушений, связанных с клетками, экспрессирующими CD38, например, опухолевыми клетками или иммунными клетками, экспрессирующими CD38. Например, фармацевтические композиции можно вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*, или людям, например, *in vivo*, для лечения или профилактики различных нарушений и заболеваний. Используемый в данном описании термин «субъект» применяется по отношению к человеку и животным, не относящимся к человеку, которые могут получить пользу или ответить на антитело. Субъекты могут, например, включать пациентов-людей, страдающих заболеваниями или нарушениями, которые можно скорректировать или улучшить путем модулирования функции CD38, такой как ферментативная активность, и/или индукции лизиса, и/или устранения/уменьшения количества клеток, экспрессирующих CD38, и/или снижения количества CD38 на клеточной мембране. Соответственно, фармацевтические композиции можно использовать для проявления *in vivo* или *in vitro* одной или нескольких из следующих биологических активностей: КЗЦ клетки, экспрессирующей CD38 в присутствии комплемента; ингибирование активности CD38-циклазы; фагоцитоз или АЗКЦ клетки, экспрессирующей CD38, в присутствии эффекторных клеток человека; и трогоцитоз экспрессирующих CD38 клеток, таких как опухолевые клетки или иммунные клетки.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции по настоящему изобретению для приготовления



лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или расстройства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения при лечении или профилактике заболевания или расстройства, например, для применения при лечении или профилактике заболевания или расстройства, включающего клетки, экспрессирующие CD38, например, для применения при лечении заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими CD38.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, включающему введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

В одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения при лечении или профилактике заболевания или расстройства.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, включающему введение фармацевтической композиции по изобретению нуждающемуся в этом субъекту, как правило, в терапевтически эффективном количестве и/или в течение времени, достаточного для лечения заболевания или расстройства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, включающему стадии:

- выбор субъекта, страдающего от заболевания или расстройства, и
- введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению, как правило, в терапевтически эффективном количестве и/или в течение времени, достаточного для лечения заболевания или расстройства.

В одном воплощении заболевание или нарушение, вовлекающее клетки, экспрессирующие CD38, представляет собой раковое заболевание, то есть опухолеродное расстройство, такое как нарушение, характеризующееся присутствием опухолевых клеток или иммунных клеток, экспрессирующих CD38, включая, например, гематологические виды раковых заболеваний, такие как В-клеточная лимфома, злокачественные новообразования плазматических клеток, Т/НК-клеточная лимфома, миелоидные злокачественные новообразования, а также солидные злокачественные опухоли.

В некоторых воплощениях заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, вовлекающий опухолевые клетки, экспрессирующие CD38.

В некоторых воплощениях заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, вовлекающее иммуносупрессирующие клетки, экспрессирующие CD38, такие как нераковые иммуносупрессирующие клетки, экспрессирующие CD38.

В некоторых воплощениях заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, затрагивающее как опухолевые клетки, так и иммуносупрессирующие клетки, экспрессирующие CD38.

В некоторых воплощениях заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, вовлекающее иммуносупрессирующие клетки, экспрессирующие CD38, и опухолевые клетки, не экспрессирующие CD38.

В других воплощениях заболевание или нарушение представляет собой воспалительное и/или аутоиммунное заболевание или нарушение, вовлекающее клетки, экспрессирующие CD38.

В других воплощениях заболевание или нарушение представляет собой нарушение обмена веществ, вовлекающее клетки, экспрессирующие CD38.

Фармацевтическую композицию можно вводить субъекту или пациенту любым подходящим путем и способом, как раскрыто в другом разделе настоящего описания. В конкретном воплощении фармацевтическую композицию вводят внутривенной инъекцией или инфузией. Фармацевтическая композиция необязательно может быть разбавлена подходящим разбавителем до или вместе с внутривенными инфузией или инъекцией.

*Гематологические раковые заболевания:*

В одном аспекте заболевание или нарушение представляет собой гематологическое раковое заболевание. Примеры таких раковых гематологических заболеваний включают В-клеточные лимфомы/лейкозы, в том числе предшественники В-клеточных лимфобластных лейкозов/лимфом и В-клеточные неходжкинские лимфомы; острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и зрелые В-клеточные новообразования, такие как В-клеточный хронический лимфолейкоз (CLL)/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарная лимфома, мантийно-клеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), в том числе FL низкой, средней и высокой степени злокачественности, кожную лимфому из клеток центра фолликула, В-клеточную лимфому маргинальной зоны (тип MALT, узловой и селезеночный тип), волосатоклеточный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта, плазмочитому, миелому плазматических клеток, лейкоз плазматических клеток, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, макроглобулинемию Вальденстрема, лейкозы плазматических клеток и анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL).

Примерами В-клеточных неходжкинских лимфом являются лимфоматоидный гранулематоз, первичная выпотная лимфома, внутрисосудистая крупноклеточная В-

клеточная лимфома, средостенная крупноклеточная В-клеточная лимфома, заболевания тяжелых цепей (включая  $\gamma$ -,  $\mu$ - и  $\alpha$ -заболевания), лимфомы, вызванные терапией иммунодепрессантами, такие как циклоспорин-индуцированная лимфома и метотрексат-индуцированная лимфома.

В одном воплощении настоящего изобретения заболевание, затрагивающее клетки, экспрессирующие CD38, представляет собой лимфому Ходжкина.

Другие примеры расстройств, связанных с клетками, экспрессирующими CD38, включают злокачественные заболевания, происходящие из Т- и NK-клеток, включая новообразования зрелых Т-клеток и NK-клеток, включая Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз, агрессивный NK-клеточный лейкоз, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, назальный тип, Т-клеточную лимфому энтеропатического типа, гепатолиенальную Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому типа подкожного панникулита, бластную NK-клеточную лимфому, грибовидный микоз/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания (первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома С-ALCL, лимфоматоидный папулез, пограничные поражения), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому неутонченную и анапластическую крупноклеточную лимфому.

Примеры злокачественных заболеваний, происходящих из миелоидных клеток, включают острый миелоидный лейкоз, в том числе острый промиелоцитарный лейкоз, и хронические миелолиферативные заболевания, включая хронический миелоидный лейкоз.

В некоторых воплощениях гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), фолликулярной лимфомы (FL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). В одном воплощении ALL представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз (В-ALL).

В некоторых воплощениях рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL) и фолликулярной лимфомы (FL).

В некоторых воплощениях гематологический рак выбран из группы, состоящей из

множественной миеломы (ММ), В-клеточной лимфомы и острого миелогенного лейкоза (AML). Неограничивающие примеры В-клеточной лимфомы включают, например, мантийно-клеточную лимфому (MCL), лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому (FL) и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ALL).

В некоторых воплощениях гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфолейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), В-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) и миелодиспластического синдрома (MDS). В одном воплощении В-клеточная лимфома выбрана из мантийноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы (FL). В одном воплощении ALL представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз (В-ALL). Фармацевтическая композиция для применения при лечении или профилактике гематологического ракового заболевания может быть, например, введена субъекту или пациенту путем внутривенной инъекции или инфузии. Фармацевтическая композиция необязательно может быть разбавлена подходящим разбавителем до или вместе с внутривенными инфузией или инъекцией.

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой множественную миелому (ММ).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой В-клеточную лимфому.

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой хронический лимфолейкоз (CLL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой мантийноклеточную лимфому (MCL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой фолликулярную лимфому (FL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой острый миелогенный лейкоз (у взрослых) (AML).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз (В-ALL).

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой лимфому

Беркитта.

В некоторых воплощениях раковое заболевание представляет собой миелодиспластический синдром (MDS).

*Злокачественные солидные опухоли:*

В одном аспекте заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, представляющее собой солидную опухоль. То есть больной, страдающий раковым заболеванием, имеет солидную опухоль.

Примеры солидных опухолей включают, без ограничения указанным, меланому, рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, колоректальный рак, рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак желудка, рак яичников, желудочный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак пищевода или желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак маточной трубы, рак головного мозга, рак уретры, рак мочеполовой системы, рак эндометрия, рак шейки матки, аденокарциному легкого, почечно-клеточную карциному (RCC) (например, светлоклеточную карциному почки или папиллярно-клеточную карциному почки), мезотелиому, карциному носоглотки (NPC), карциному пищевода или желудочно-кишечного тракта или метастатическое поражение любого из них.

В одном предпочтительном варианте солидная опухоль возникает из раковой опухоли, который содержит иммуносупрессирующие клетки, такие как Treg, и которые экспрессируют CD38. Регуляторные T-клетки (Treg) могут иметь высокую экспрессию CD38, а Treg с высокой экспрессией CD38 обладают более выраженным иммуносупрессивным действием по сравнению с Treg со средней экспрессией CD38 (Krejci J. et al. Blood 2016 128:384-394). Соответственно, без привязки к теории, способность антитела, содержащегося в фармацевтической композиции по изобретению, снижать количество CD38, экспрессируемого на Treg посредством трофоцитоза, в особенности позволяет проводить лечение солидных опухолей у пациентов, у которых Treg экспрессируют CD38. Treg экспрессируют CD38, когда экспрессия CD38 на Treg является статистически значимой по сравнению с контролем, например, экспрессия, обнаруженная с помощью анти-CD38 антитела, по сравнению с экспрессией, обнаруженной с помощью изотипического контрольного антитела с использованием хорошо известных способов. Это можно проверить, например, путем взятия биологического образца, такого как образец крови, образец костного мозга или биопсия опухоли.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, представляющей собой фармацевтическую композицию для применения при лечении или профилактике солидной опухоли у субъекта, содержащей Treg, экспрессирующие CD38.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения солидной опухоли у субъекта, содержащей Treg, экспрессирующие CD38, способу, включающему введение фармацевтической композиции по изобретению, как правило, в терапевтически эффективном количестве и/или в течение времени, достаточного для лечения заболевания или расстройства.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой меланому.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак легкого.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой неплоскоклеточный NSCLC.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой колоректальный рак.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак желудка.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак яичника.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак желудка.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак печени.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак щитовидной железы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой карциному пищевода или желудочно-кишечного тракта.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак фаллопиевой трубы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак головного мозга.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак уретры.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак мочеполовой системы.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак эндометрия.

В некоторых воплощениях солидная опухоль представляет собой рак шейки матки.

В некоторых воплощениях в опухолевых клетках солидной опухоли отсутствует определяемая экспрессия CD38. В опухолевых клетках солидной опухоли отсутствует определяемая экспрессия CD38, когда экспрессия CD38 на опухолевых клетках, выделенных из солидной опухоли, является статистически незначимой по сравнению с контролем, например, экспрессия, обнаруженная с помощью анти-CD38 антитела, по сравнению с экспрессией, обнаруженной с помощью изотипического контрольного антитела с использованием хорошо известных способов. Это можно проверить, например, взяв биологический образец, такой как биопсия, из опухоли.

В некоторых воплощениях рак возникает у пациента, содержащего регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CD38.

В конкретных воплощениях фармацевтическую композицию вводят в терапевтически эффективном количестве и/или в течение периода времени, достаточного для лечения ракового заболевания.

#### *Метаболические нарушения:*

В одном аспекте заболевание или нарушение представляет собой метаболическое нарушение. То есть больной страдает нарушением обмена веществ.

В некоторых воплощениях метаболическое нарушение представляет собой амилоидоз. Амилоидоз представляет собой обширную группу заболеваний, определяемых наличием нерастворимых белковых отложений в тканях. Его диагноз основывается на гистологических данных. В другом воплощении амилоидоз может представлять собой AL-амилоидоз.

#### *Пациенты:*

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована для лечения множественной миеломы у пациента с недавно диагностированной множественной миеломой.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему

изобретению может быть использована для лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, который ранее получал по меньшей мере одно лечение того же заболевания или расстройства одним или несколькими соединениями, при этом указанное одно или несколько соединений отличаются от фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Заболевание или расстройство может быть любым заболеванием или расстройством, описанным в данной заявке; такое как раковое заболевание, воспалительное и/или аутоиммунное заболевание или нарушение, затрагивающее клетки, экспрессирующие CD38, или метаболическое нарушение, затрагивающее клетки, экспрессирующие CD38.

Например, в некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована для лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, ранее получавшего лечение ингибитором протеасом (PI) и/или иммуномодулирующим лекарственным средством (IMiD). Примеры ингибиторов протеасом включают, без ограничения указанным, бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб. Примеры IMiD включают, без ограничения указанным, талидомид, леналидомид и помалидомид. В другом воплощении указанное заболевание или нарушение может представлять собой рак или опухоль, такую как множественная миелома, лимфома из клеток мантийной зоны или миелодиспластический синдром (MDS). Таким образом, субъект может быть раковым пациентом, таким как пациент с множественной миеломой, мантийно-клеточной лимфомой или пациентом с миелодиспластическим синдромом (MDS). В конкретном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначена для лечения или профилактики множественной миеломы у субъекта или пациента, ранее получавшего лечение ингибитором протеасом (PI) и/или иммуномодулирующим лекарственным средством (IMiD). Фармацевтическую композицию можно, например, вводить субъекту или пациенту путем внутривенной инъекции или инфузии. Фармацевтическая композиция необязательно может быть разбавлена подходящим разбавителем до или вместе с внутривенными инфузией или инъекцией.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована для лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, который ранее не подвергался лечению анти-CD38 антителом. Как правило, такого субъекта или пациента называют пациентом, ранее не получавшим анти-CD38 антитела. В одном воплощении CD38-антитело представляет собой даратумумаб; т.е. субъект или пациент ранее не получали лечения даратумумабом. Таким образом, в одном воплощении субъект или пациент является субъектом/пациентом, ранее не получавшим даратумумаб.



Заболевание или расстройство может быть раком или опухолью, или метаболическим заболеванием, таким как амилоидоз, в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в настоящем описании. В конкретном воплощении фармацевтическая композиция по изобретению предназначена для лечения или профилактики множественной миеломы (ММ) у субъекта или пациента, ранее не получавших даратумумаб. В конкретном воплощении фармацевтическую композицию вводят субъекту или пациенту путем внутривенной инъекции или инфузии. Фармацевтическая композиция необязательно может быть разбавлена подходящим разбавителем до или вместе с внутривенными инфузией или инъекцией.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, который ранее получил по меньшей мере одно лечение, включающее CD38-антитело.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция для лечения раковых пациентов, которые ранее получали по меньшей мере одно лечение, включающее CD38-антитело. Настоящее изобретение также предлагает фармацевтическую композицию для лечения пациентов с метаболическим заболеванием, таким как амилоидоз, которые ранее получали по меньшей мере одно лечение, включающее CD38-антитело. Такой предшествующей терапией может быть один или несколько циклов запланированной программы лечения, включающей CD38-антитело, например, один или несколько запланированных циклов лечения CD38-антителом в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии, а также последовательность курсов лечения, проводимых планомерным образом. В одном воплощении предшествующая терапия представляла собой монотерапию CD38-антителом. В одном воплощении предшествующая терапия представляла собой комбинированную терапию, включающую CD38-антитело. Например, предшествующая терапия могла состоять из CD38-антител в сочетании с ингибитором протеасом (PI) и иммуномодулирующим средством. В некоторых воплощениях CD38-антитело представляет собой даратумумаб.

В некоторых аспектах раковый пациент также может быть пациентом, у которого введение даратумумаба в качестве монотерапии имеет ограниченный эффект.

В некоторых аспектах раковое заболевание можно охарактеризовать как раковое заболевание, которое является «рефрактерным» или «рецидивирующим» к предшествующей терапии. В другом воплощении предыдущая терапия может включать введение одного или нескольких средств из PI, IMiD и CD38-антитела, например, где CD38-антитело представляет собой даратумумаб. Как правило, это указывает на то, что

предыдущая терапия не достигла полного ответа (ПО), например, что раковое заболевание не отвечало на моно- или комбинированную терапию CD38-антителом или что раковое заболевание прогрессировало в течение заранее определенного периода времени после окончания терапии CD38-антителами. Примеры такой комбинированной терапии включают, без ограничения указанным, комбинацию CD38-антитела с PI или IMiD или комбинацию PI и IMiD. Точно так же это может указывать на то, что предыдущая терапия не достигла полного ответа (ПО), например, что рак не реагировал на PI, IMiD или их комбинированную терапию, или что раковое заболевание прогрессировало в течение заранее определенного периода времени после окончания указанной терапии. Квалифицированный специалист может определить, является ли раковое заболевание рефрактерным к предшествующей терапии, на основании того, что известно в данной области, включая рекомендации, доступные для каждого вида ракового заболевания.

Например, при множественной миеломе рефрактерное и рецидивирующее заболевание можно выявить в соответствии с рекомендациями, опубликованными Rajkumar, Harousseau et al. от имени Согласительной группы Международного семинара по миеломе, Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel, Blood 2011;117:4691-4695.

Рефрактерная миелома может быть определена как заболевание, не отвечающее на первичную или терапию спасения, или прогрессирующее в течение 60 дней после последней терапии. Неотвечающее заболевание определяется как неспособность достичь минимального ответа или развитие прогрессирующего заболевания (PD) во время терапии. Различают 2 категории рефрактерной миеломы: «рецидивно-рефрактерная миелома» и «первично-резистентная миелома».

Рецидивирующая и рефрактерная миелома может быть определена как заболевание, которое не реагирует на терапию спасения или прогрессирует в течение 60 дней после последней терапии у пациентов, которые достигли минимального ответа (MR) или лучшего ответа в какой-то момент времени, предшествующий прогрессирующему течению заболевания.

Первичная рефрактерная миелома может быть определена как заболевание, не поддающееся лечению у пациентов, у которых никогда не было достигнуто минимального или лучшего ответа на какую-либо терапию. Сюда входят пациенты, которые никогда не достигают MR или лучшего ответа, у которых нет значительных изменений в протеине M и нет признаков клинического прогрессирования, а также первичной рефрактерности PD, когда пациенты соответствуют критериям истинной PD. При сообщении об эффективности лечения пациентов с первичной рефрактерностью следует отдельно

указать эффективность в этих двух подгруппах («не отвечающая на лечение-непрогрессирующая» и «прогрессирующая»).

Рецидивирующая миелома может быть определена как ранее леченная миелома, которая прогрессирует и требует начала терапии спасения, но не соответствует ни критериям категорий «первичная рефрактерная миелома», ни «рецидивирующая-рефрактерная миелома».

Для получения подробной информации о конкретных ответах (CR, PR и т. д.) при множественной миеломе и о том, как их тестировать, см. Rajkumar, Harousseau et al., 2011 (см. выше).

Соответственно, в некоторых вариантах фармацевтическая композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения предназначена для применения при лечении ракового заболевания, который не поддается предшествующему лечению, включающему введение одного или нескольких лекарственных средств из PI, IMiD и CD38-антитела. В одном воплощении предварительное лечение включает введение CD38-антитела. В одном воплощении предварительное лечение включает введение PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, а также PI и IMiD. В конкретном воплощении раковое заболевание идентифицируют как рефрактерное раковое заболевание перед применением.

В другом воплощении предложен способ лечения ракового заболевания у субъекта, включающий стадии:

- (i) идентификацию субъекта как рефрактерного к предшествующему лечению, включающему введение одного или более средств из PI, IMiD и CD38-антитела, и
- (ii) введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения.

В одном варианте предварительное лечение включает CD38-антитело. В одном воплощении предварительное лечение включает PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, PI и IMiD.

В другом воплощении предлагается способ лечения ракового заболевания, рефрактерного к предшествующему лечению, включающему введение одного или более средств из PI, IMiD и CD38-антитела, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения. В одном воплощении

предварительное лечение включает CD38-антитело. В одном воплощении предварительное лечение включает PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, PI и/или IMiD.

В некоторых воплощениях PI выбран из группы, состоящей из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба.

В некоторых воплощениях IMiD выбран из группы, состоящей из талидомида, леналидомида и помалидомида.

В некоторых воплощениях CD38-антитело представляет собой даратумумаб.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения предназначена для применения при лечении ракового заболевания, которое рецидивирует после предшествующего лечения, включающего введение одного или более средств из PI, IMiD и CD38-антитела. В одном воплощении предварительное лечение включает CD38-антитело. В одном воплощении предварительное лечение включает PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, PI и IMiD. В конкретном воплощении раковое заболевание идентифицируют как рецидив перед применением.

В другом воплощении предложен способ лечения ракового заболевания у субъекта, включающий стадии:

- (i) идентификации субъекта с рецидивом после предшествующего лечения, включающего введение одного или более средств из PI, IMiD и CD38-антитела, и
- (ii) введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения.

В одном воплощении предварительное лечение включает CD38-антитело. В одном воплощении предварительное лечение включает PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, PI и IMiD.

В другом воплощении предлагается способ лечения рецидива рака после предшествующего лечения, включающего введение одного или более средств из PI, IMiD и CD38-антитела, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения. В одном воплощении предварительное лечение включает CD38-антитело. В одном воплощении предварительное лечение включает PI и/или IMiD. В одном воплощении предварительное

лечение включает введение двух или более средств из CD38-антитела, PI и IMiD.

В некоторых воплощениях PI выбран из группы, состоящей из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба.

В некоторых воплощениях IMiD выбирают из группы, состоящей из талидомида, леналидомида и помалидомида.

В некоторых воплощениях CD38-антитело представляет собой даратумумаб.

В конкретных воплощениях фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве и/или в течение периода времени, достаточного для лечения рефрактерного или рецидивирующего ракового заболевания.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой гематологическое раковое заболевание.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), мантийноклеточной лимфомы (MCL), фолликулярной лимфомы (FL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) и фолликулярной лимфомы (FL).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой множественную миелому (MM).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой хронический лимфолейкоз (CLL).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой мантийно-клеточную лимфому (MCL).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой фолликулярную лимфому (FL).

В конкретном воплощении фармацевтическая композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения предназначена для применения при

лечении рефрактерной или рецидивирующей множественной миеломы (ММ) у субъекта или пациента после предшествующего лечения, включающего введение PI, IMiD или и тгоо, и другого. В конкретном воплощении фармацевтическую композицию вводят субъекту или пациенту путем внутривенной инъекции или инфузии. Фармацевтическая композиция необязательно может быть разбавлена подходящим разбавителем до или вместе с внутривенными инфузией или инъекцией.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой солидную опухоль. В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), неплоскоклеточного NSCLC, колоректального рака, рака предстательной железы, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака желудка, рака яичников, желудочного рака, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака пищевода или желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака маточной трубы, рака головного мозга, рака уретры, рака мочеполовой системы, рака эндометрия, рака шейки матки.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой меланому.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак легкого.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой неплоскоклеточный NSCLC.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой колоректальный рак.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак желудка.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак яичников.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой желудочный рак.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак печени.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак щитовидной железы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой карциному пищевода или желудочно-кишечного тракта.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак молочной железы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак маточной трубы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак головного мозга.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак уретры.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак мочеполовой системы.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак эндометрия.

В некоторых воплощениях рефрактерное или рецидивирующее раковое заболевание представляет собой рак шейки матки.

*Аутоиммунные и воспалительные заболевания и нарушения:*

В другом воплощении настоящего изобретения нарушение, вовлекающее клетки, экспрессирующие CD38, представляет собой иммунное нарушение, в которое вовлечены В-клетки, макрофаги, плазматические клетки, моноциты и Т-клетки, экспрессирующие CD38, такое как воспалительное и/или аутоиммунное заболевание. Примеры иммунных нарушений, в которые вовлечены В-клетки, плазматические клетки, моноциты и Т-клетки, экспрессирующие CD38, включают аутоиммунные заболевания, такие как псориаз, псориатический артрит, дерматит, системная склеродермия и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-

синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзема, астма, атеросклероз, недостаточность адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, юношеский диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунокомплексный нефрит, IgA-нефропатия, IgM-полиневропатии, иммуноопосредованные тромбоцитопении, такие как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, тяжелая миастения, волчаночный нефрит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит (RA), атопический дерматит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, гранулематоз Вегенера, синдром Оменна, хроническая почечная недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, рассеянный склероз, HIV и заболевания, ассоциированные с вирусом герпеса. Другими примерами являются тяжелый острый респираторный дистресс-синдром и хореоретинит. Кроме того, включены другие заболевания и расстройства, такие как те, которые вызваны или опосредованы инфекцией В-клеток вирусом, таким как вирус Эпштейна-Барр (EBV).

В одном воплощении расстройство, вовлекающее клетки, экспрессирующие CD38, представляет собой ревматоидный артрит.

Дополнительные примеры воспалительных, иммунных и/или аутоиммунных заболеваний, при которых выражены аутоантитела и/или чрезмерная активность В- и Т-лимфоцитов и которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают следующие: васкулиты и другие сосудистые заболевания, такие как микроскопический полиангиит, синдром Чарга-Стросса и другие ANCA-ассоциированные васкулиты, узелковый полиартериит, эссенциальный криоглобулинемический васкулит, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Кавасаки, артериит Такаясу, гигантоклеточный артрит, пурпура Шенлейна-Геноха, первичный или изолированный церебральный ангиит, узловатая эритема, облитерирующий тромбангиит, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (включая гемолитико-уремический синдром) и вторичные васкулиты, включая кожный лейкоцитокластический васкулит (например, вторичный по отношению к гепатиту В, гепатиту С, макроглобулинемии Вальденстрема, В-клеточным новообразованиям, ревматоидному артриту, синдрому Шегрена или системной красной волчанке); другими примерами являются узловатая эритема, аллергический васкулит, панникулит, болезнь Вебера-Кристиана, гиперглобулинемическая пурпура и болезнь Бюргера; кожные заболевания, такие как контактный дерматит, линейный IgA-дерматоз, витилиго, гангренозная пиодермия, приобретенный буллезный эпидермолиз, вульгарная пузырчатка (включая рубцовый пемфигоид и буллезный пемфигоид), очаговая алопеция (включая универсальную и тотальную алопецию), герпетиформный дерматит,



мультиформная эритема и хроническая аутоиммунная крапивница (включая ангионевротический отек и уртикарный васкулит); иммуноопосредованные цитопении, такие как аутоиммунная нейтропения и чистая эритроцитарная аплазия; заболевания соединительной ткани, такие как волчанка ЦНС, дискоидная красная волчанка, CREST-синдром, смешанное заболевание соединительной ткани, полимиозит/дерматомиозит, миозит с тельцами включения, вторичный амилоидоз, криоглобулинемия типа I и типа II, фибромиалгия, синдром фосфолипидных антител, вторичная гемофилия, рецидивирующий полихондрит, саркоидоз, синдром мышечной скованности и ревматическая лихорадка; еще одним примером является эозинофильный фасциит; артриты, такие как анкилозирующий спондилит, ювенильный хронический артрит, болезнь Стилла взрослых и синдром SAPHO; другими примерами являются сакроилеит, реактивный артрит, болезнь Стилла и подагра; гематологические расстройства, такие как апластическая анемия, первичная гемолитическая анемия (включая синдром холодových агглютининов), гемолитическая анемия, вторичная по отношению к CLL или системной красной волчанке; синдром POEMS, пернициозная анемия и гиперглобулинемическая пурпура Вальдемстрема; другими примерами являются агранулоцитоз, аутоиммунная нейтропения, болезнь Франклина, болезнь Зелигмана, гамма-болезнь тяжелых цепей, паранеопластический синдром, вторичный по отношению к тимоме и лимфомам, паранеопластический синдром, вторичный по отношению к тимоме и лимфомам, и образование ингибитора фактора VIII; эндокринопатии, такие как полиэндокринопатия и болезнь Аддисона; другими примерами являются аутоиммунная гипогликемия, аутоиммунный гипотиреоз, аутоиммунный инсулиновый синдром, тиреоидит де Кервена и резистентность к инсулину, опосредованная антителами к рецепторам инсулина; гепато-желудочные расстройства, такие как глютеновая болезнь, болезнь Уиппла, первичный билиарный цирроз, хронический активный гепатит и первичный склерозирующий холангиит; еще одним примером является аутоиммунный гастрит; нефропатии, такие как быстро прогрессирующий гломерулонефрит, постстрептококковый нефрит, синдром Гудпасчера, мембранозный гломерулонефрит и криоглобулинемический нефрит; еще одним примером являются болезнь минимальных изменений; неврологические расстройства, такие как аутоиммунные невропатии, множественный мононеврит, миастенический синдром Ламберта-Итона, хорея Сиденгама, спинная сухотка и синдром Гийена-Барре; другими примерами являются миелопатия/тропический спастический парапарез, тяжелая миастения, острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия; рассеянный склероз; сердечные и легочные заболевания, такие как COPD,

фиброзирующий альвеолит, облитерирующий бронхиолит, аллергический аспергиллез, кистозный фиброз, синдром Леффлера, миокардит и перикардит; другими примерами являются гиперчувствительный пневмонит и паранеопластический синдром, вторичный по отношению к раку легкого; аллергические расстройства, такие как бронхиальная астма и синдром гипер-IgE; еще одним примером является временный амавроз; офтальмологические расстройства, такие как идиопатический хориоретинит; инфекционные заболевания, такие как инфекция парвовируса В (включая синдром «кисть-стопа»); гинекологические-акушерские расстройства, такие как повторяющиеся аборт, рецидивирующие потери плода и задержка внутриутробного развития; еще одним примером является паранеопластический синдром, вторичный по отношению к гинекологическим новообразованиям; расстройства мужской репродуктивной системы, такие как паранеопластический синдром, вторичный по отношению к новообразованиям яичек; и нарушения, связанные с трансплантацией, такие как отторжение аллотрансплантата и ксенотрансплантата и болезнь «трансплантат против хозяина».

В одном воплощении заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит.

Таблица 1. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
1	VH-3003-C	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA <b>FGGTFSSYA</b> ISW VRQAPGQGLEWMGR <b>IIRFLG</b> IANYAQKFQGRVTLIA DKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC <b>AGEPGERDPDA</b> <b>VDIWGQGTMTVSS</b>
2	VH-3003-C CDR1	GGTFSSYA
3	VH-3003-C CDR2	IIRFLGIA
4	VH-3003-C CDR3	AGEPGERDPDAVDI
5	VL(Кappa)-3003-C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <b>QGIRSW</b> LAWY QQKPEKAPKSLIY <b>AASSLQSGVPSRFS</b> SGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC <b>QQYNSYPLT</b> FGGGTKVEIK
6	VL(Кappa)-3003-C CDR1	QGIRSW
	VL(Кappa)-3003-C CDR2	AAS
7	VL(Кappa)-3003-C CDR3	QQYNSYPLT
8	VH-3003-B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVS <b>GFTFNSF</b> AMSW VRQAPGKGLEWVSA <b>ISGSGGGTY</b> YADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFC <b>AKDKILWFGE</b> P <b>VDYWGQGTMTVSS</b>
9	VL(Кappa)-3003-B	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQ QKPGQAPRLLIY <b>DAS</b> NRATGIPARFSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYC <b>QORSNWPPT</b> FGGQTKVEIK
10	VH-3003-A	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA <b>SGGTFSSYA</b> FS WVRQAPGQGLEWMGR <b>VIPFLG</b> IANSAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYC <b>ARDDIAALGP</b> <b>FDYWGQGTMTVSS</b>
11	VL(Кappa)-3003-A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <b>QGISSW</b> LAWY QQKPEKAPKSLIY <b>AASSLQSGVPSRFS</b> SGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC <b>QQYNSYPRT</b> FGGQTKVEIK

12	VH-gp120-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIH WVRQAPGQRFQEWGMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVT FTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSW <b>DDSPQDNYMDVWVGKTTVIVSS</b>
13	VH-gp120-b12 CDR1	GYRFSNFV
14	VH-gp120-b12 CDR2	INPYNGNK
15	VH-gp120-b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYMDV
16	VL-gp120-b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHHSIRSRVAVWY QHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGGTDFTL TITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
17	VL-gp120-b12 CDR1	HSIRSRR
	VL-gp120-b12 CDR2	GVS
18	VL-gp120-b12 CDR3	QVYGASSYT
19	константная область HC человека IgG1m(za) (Учетный номер Uniprot P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <b>K</b> VEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSR <del>DEL</del> TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
20	константная область HC человека IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <b>R</b> VEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
21	константная область HC человека IgG1m(z)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <b>K</b> VEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
22	константная область HC человека IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <b>P</b> VEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSR <del>DEL</del> TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
23	константная область HC человека IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <b>P</b> VEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

		DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE <u>G</u> LHNHYTQKSLS LSPGK
24	константная область HC человека IgG1m(f)-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLS LSPGK
25	константная область HC человека IgG1m(f)-E430S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>S</u> ALHNHYTQKSLS LSPGK
26	константная область HC человека IgG1m(f)-E430F	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>F</u> ALHNHYTQKSLS LSPGK
27	константная область HC человека IgG1m(f)-E430T	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>T</u> ALHNHYTQKSLS LSPGK
28	константная область HC человека IgG1m(f)-E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
29	константная область HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV

	человека IgG1m(f)-E345Q	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPRQPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
30	константная область HC человека IgG1m(f)-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
31	константная область HC человека IgG1m(f)-E345Y	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPRYPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
32	константная область HC человека IgG1m(f)-S440W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKWL SLSPGK
33	константная область HC человека IgG1m(f)-S440Y	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK <del>Y</del> LS LSPGK
34	константная область HC человека IgG2 (Учетный номер Uniprot P01859)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS NFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK <del>Y</del> LS

		VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
35	константная область HC человека IgG3 (Учетный номер Uniprot P01860)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHT CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMHEALHNR TQKSLSLSPGK
36	константная область HC человека IgG4 (Учетный номер Uniprot P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K
37	константная область LC Каппа человека	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	CD38 человека (Учетный номер Uniprot P28907)	MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSVILVILVV VLAVVPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARC VKYTE HPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQP LMKLGTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFT LEDTLGLYLAADDLTWCGEFNNTSKINYQSCPDWRKD CSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGRSRK IFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDS RDLCDPTIKELESIIISKRNIFSCCKNIYRPDKFLQCV KNPEDSSCTSEI
39	hisCD38	HHHHHRWRQTSWGPSTTKRFPETVLARC VKYTEI HPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPL MKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTL EDTLGLYLAADDLTWCGEFNNTSKINYQSCPDWRKDCS NNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGRSRKIF DKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRD LCQDPTIKELESIIISKRNIFSCCKNIYRPDKFLQCVKNP EDSSCTSEI
40	Варианты VH CDR1	GGTFX <sub>1</sub> SYA, где X <sub>1</sub> представляет собой S или R
41	Варианты VH CDR2	IX <sub>1</sub> FLGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> , где X <sub>1</sub> представляет собой R или V; X <sub>2</sub> представляет собой I или K; и X <sub>3</sub> представляет собой A, T или V, например, A или T
42	Варианты VH CDR3	X <sub>1</sub> GEPGX <sub>2</sub> RDPDAX <sub>3</sub> DI, где X <sub>1</sub> представляет собой A или T; X <sub>2</sub> представляет собой E, D или A, например, E или D; и X <sub>3</sub> представляет собой V или F
43	VL CDR1	QGIRSW
	VL CDR2	AAS
44	Варианты VL CDR3	QQYNX <sub>1</sub> YPLT, где X <sub>1</sub> представляет собой S или N
45	константная область HC человека IgG1m(f) без Lys (K) в положении 447 в соответствии с	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

	нумерацией Eu	DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
46	константная область HC человека IgG1m(f)-E430G, без Lys (K) в положении 447 в соответствии с нумерацией Eu	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLS LSPG

### Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

#### *Пример 1. Антитела и клеточные линии*

##### Конструкции для экспрессии антител

Для экспрессии человеческих и гуманизированных антител, используемых в настоящем изобретении, последовательности варибельной области тяжелой (VH) цепи и варибельной области легкой цепи (VL) были получены путем генного синтеза (GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific) и клонированы в экспрессирующих векторах pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific), содержащих константную область тяжелой цепи (HC) IgG человека (константная область IgG1m(f) HC человека: SEQ ID NO:20) и/или константную область легкой цепи каппа человека (LC): SEQ ID NO:37. Искомые мутации были внесены путем генного синтеза. CD38-антитела в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанных CD38-антител IgG1-A (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO:10; VL: SEQ ID NO:11), IgG1-B (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO:8; VL: SEQ ID NO:9) и IgG1-C (WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO:1; VL: SEQ ID NO:5). Человеческое антитело IgG1 b12, антитело, специфичное к gp120 HIV, использовали в качестве отрицательного контроля в некоторых экспериментах (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23; VH: SEQ ID NO:12; VL: SEQ ID NO:16).

##### Конструкции антител с транзиторной экспрессией

Смеси плазмидной ДНК, кодирующей как тяжелые, так и легкие цепи антител, транзиторно трансфицировали в клетки Expi293F (Gibco, кат. № A14635) с использованием 293fectin (Life Technologies), по существу, как описано Vink et al. (Vink et al., 2014 Methods 65(1):5-10). Концентрации антител в надосадочных жидкостях измеряли

по оптической плотности при 280 нм. Надосадочные жидкости, содержащие антитела, либо непосредственно использовали в анализах *in vitro*, либо антитела очищали, как описано ниже.

#### Очистка антител и оценка качества

Антитела очищали аффинной хроматографией на протеине А. Надосадочные жидкости культур фильтровали через тупиковый фильтр 0,20 мкм и загружали на 5 мл колонки MabSelect SuRe (GE Healthcare), промывали и элюировали 0,02 М цитратом натрия-NaOH, pH 3. Элюаты загружали в колонку HiPrep Desalting (GE Healthcare) сразу после очистки, и антитела заменяли буфером на 12,6 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 мМ NaCl, буфер pH 7,4 (B.Braun или Thermo Fisher). После замены буфера образцы стерилизовали фильтрованием через тупиковые фильтры 0,2 мкм. Очищенные белки анализировали с помощью ряда биоаналитических анализов, включая капиллярный электрофорез на гелях додецилсульфат-полиакриламид натрия (CE-SDS) и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HP-SEC). Концентрацию измеряли по поглощению при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 2-8°C.

Клеточные линии, использованные в Примерах, описаны в таблице 2 ниже. Среднее количество молекул CD38 и CD59 на клетку определяли с помощью количественной проточной цитометрии (Qifi, DAKO).

Таблица 2. Обзор клеточных линий и экспрессии CD38 и CD59

клеточная линия	тип опухоли	Каталог	поставщик	Предполагаемые ABC	
				CD38	CD59
SU-DHL-8	DLBCL	ACC 573	DSMZ	415000	31000
Oci-Ly-7	DLBCL	ACC 688	DSMZ	310000	81000
Oci-Ly-19	DLBCL	ACC 528	DSMZ	271000	28000
Ramos	Burkitt	CRL-1596	ATCC	260000	7000
Daudi	Burkitt	CCL-213	ATCC	200000	0
Oci-Ly18	DLBCL	ACC 699	DSMZ	181000	40000
Raji	Burkitt	CCL-86	ATCC	170000	55000
DOHH2	FL	ACC 47	DSMZ	167000	66000
SU-DHL-4	DLBCL	ACC 495	DSMZ	158000	147000
WSU-DLCL2	DLBCL	ACC 575	DSMZ	150000	96000
Z-138	MCL	CRL-3001	ATCC	133000	53000
JVM-13	MCL	CRL-3003	ATCC	130000	254000
REH	B-ALL	ACC 22	DSMZ	130000	не протестировано
Jeko-1	MCL	ACC 553	DSMZ	108000	31000
Wien133	Burkitt	-	BioAnaLab, Великобритания	100000	0
697	B-ALL	ACC 42	DSMZ	98000	130000
Granta-519	MCL	ACC 342	DSMZ	90000	140000
RS4;11	B-ALL	ACC 508	DSMZ	80-86000	не протестировано
DB	DLBCL	ACC 539	DSMZ	70000	200000



NALM-16	B-ALL	ACC 680	DSMZ	50000	не протестировано
JVM-3	CLL	ACC 18	DSMZ	30000	не протестировано
U266	MM	ACC 9	DSMZ	15000	не протестировано
RC-K8	DLBCL	ACC 561	DSMZ	10000	не протестировано
Pfeiffer	DLBCL	CRL-2632	ATCC	0	100000
THP-1	AML	ACC 16	DSMZ	400000	40000
Oci-AML3	AML	ACC 582	DSMZ	200000	40000
monomac6	AML	ACC 124	DSMZ	200000	30000
KG-1	AML	CCL-246	ATCC	180000	100000
ML-2	AML	ACC 15	DSMZ	150000	10000
U937	AML	CRL-1593.2	ATCC	130000	не протестировано
Nomo-1	AML	ACC 542	DSMZ	110000	30000
MEGAL	AML	ACC 719	DSMZ	100000	110000
AML-193	AML	ACC 549	DSMZ	100000	не протестировано
MOLM-13	AML	ACC 554	DSMZ	90000	10000
HL-60	AML	CLL-240	ATCC	90000	10000
Oci-M1	AML	ACC 529	DSMZ	0	200000
LP-1	MM	ACC 41	DSMZ	130000	15000
NCI-H929	MM	CRL-9068	ATCC	15000	155000
OPM-2	MM	CRL-9068	ATCC	70000	не протестировано
ARH77	MM	CRL-1621	ATCC	25000	100000

ABC = антитела, связанные с клеткой

Происхождение/источники клеточных линий следующие:

Клеточная линия:	Источник:
Daudi	ATCC; CCL-213
Ramos	ATCC; CRL-1596
Wien-133	BioAnaLab, Oxford, U.K
NALM-16	DSMZ; ACC 680
U266	ATCC; TIB-196
RC-K8	DSMZ; ACC 561

*Пример 2. Связывание CD38-антител с CD38 человека и яванского макака, экспрессированным на поверхности клеток*

Связывание CD38, экспрессированного на поверхности клеток Daudi и NALM16 и РВМС от яванских макаков, определяли с помощью проточной цитометрии. Клетки, ресуспендированные в RPMI, содержащем 0,2% БСА, высевали по 100000 клеток/лунку в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, кат. № 650101) и центрифугировали в течение 3 минут при  $300 \times g$ , 4°C. Добавляли серийные разведения (конечная концентрация антител 0,005-10 мкг/мл в 3-кратных серийных разведениях) CD38 или контрольных антител и клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Планшеты дважды промывали/центрифугировали с использованием буфера FACS (PBS/0,1% БСА/0,01% азид натрия). Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при

4°C с R-фикоэритрином (PE), конъюгированным с козьим антителом против IgG F(ab')<sub>2</sub> человека (Jackson), разведенным 1/100 в PBS/0,1% БСА/0,01% Na-Азид или FITC-конъюгированным с козьим антителом против IgG человека (Southern Biotech) для анализа РВМС яванского макака. Клетки дважды промывали/центрифугировали с использованием буфера FACS, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали путем определения средней интенсивности флуоресценции с использованием FACS\_Fortessa (BD). Кривые связывания были построены с использованием анализа нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) в программном обеспечении GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software).

На фиг. 2 показано, что CD38-антитела IgG1-B, IgG1-C и IgG1-A дозозависимо связываются с экспрессирующими CD38 клетками NALM16. Введение в эти антитела усиливающей гексамеризацию мутации E430G не влияло на связывание.

На фиг. 3 показано, что CD38-антитело IgG1-A-E430G, но не IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G, дозозависимо связывается с CD38, экспрессируемым на РВМС яванского макака (А). Среднее связывание с CD38, экспрессированным на клетках В, Т и НК яванского макака, изображено с гейтированием на основе FSC и SSC. В качестве положительного контроля также показано связывание с клетками Daudi, экспрессирующими большое количество копий человеческого CD38 (В).

*Пример 3. Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ) CD38-антител с мутацией E430G*

#### КЗЦCDC на линиях опухолевых клеток

Клетки Daudi, Wien133, Ramos, NALM16, U266 и RC-K8 ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 0,2% БСА, и высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one) при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунку (40 мкл/лунку). Антитела против CD38 и контрольные изотипические антитела серийно разбавляли (конечная концентрация антител 0,0002–10 мкг/мл в 3-кратных серийных разведениях) и добавляли по 40 мкл разбавленных антител на лунку. Клетки и Ab предварительно инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляли по 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (Sanquin) и инкубировали еще 45 минут при 37°C. После этого планшеты центрифугировали (3 минуты, 1200 об/мин) и отбрасывали надосадочную жидкость. Осадки клеток ресуспендировали в FACS-буфере с добавлением 0,25 мкМ TOPRO-3 iodide (Life Technologies), и лизис определяли путем измерения процента положительных по TOPRO-3 йодиду клеток на FACS\_Fortessa (BD). КЗЦ изображали как процент лизиса. Показанные данные: N = 3 (Daudi и NALM16), N = 2 (клетки Wien133 и U266) или N = 1 (RC-K8 и Ramos). Контрольные изотипические

антитела были использованы только для клеток Daudi и Wien133.

На фиг. 4 показано, что CD38-антитела В, С и А без мутации E430G индуцируют ~85, ~50 и 0 процентов лизиса клеток Ramos и Daudi. Никакого значительного лизиса этими CD38-антителами не наблюдалось ни для одной из других протестированных клеточных линий. Введение мутации E430G в эти CD38-антитела приводило к более высокой активности КЗЦ при значительно более низкой концентрации антител. Все 3 антитела с мутацией E430G индуцировали до 100% лизиса клеток Ramos и Daudi. Более того, на клеточных линиях с более низкой экспрессией CD38 CD38-антитела с мутацией E430G были способны индуцировать максимальную (Wien133) или частичную (NALM16 и U266) КЗЦ, тогда как CD38-антитела без мутации E430G не индуцировали КЗЦ. Эти результаты демонстрируют, что CD38-антитела с мутацией E430G индуцируют более сильный КЗЦ и требуют меньшей экспрессии CD38 по сравнению с CD38-антителами без мутации E430G. В опухолевых клетках с более низким уровнем экспрессии CD38 (NALM-16, RS4;11 и REH) IgG1-C-E430G показало более низкие значения EC50 по сравнению с IgG1-B-E430G.

Таблица 3. Значения EC50 для лизиса

Некоторые клеточные линии тестировались только один раз (Ramos, RS4;11, REH).

	Ramos	Daudi	Wien-133	NALM-16	U266	RS4;11	REH
В	0,126	0,183	0,199	-	-	-	-
В-E430G	0,019	0,018	0,013	0,075	-	0,243	0,054
С	0,158	0,250	0,193	-	-	-	-
С-E430G	0,014	0,019	0,015	0,022	0,052	0,056	0,017
А	-	-	-	-	-	-	-
А-E430G	0,133	0,206	0,271	-	-	-	-

Вышеописанный анализ КЗЦ был повторен с рядом других линий опухолевых клеток, полученных из В-клеточных опухолей, включая DLBCL, лимфому Беркитта, FL, MCL, В-ALL, CLL или ММ, и с антителами IgG1-B, IgG1- В-E430G, IgG1-C-E430G, IgG1- А-E430G и контрольным изотипическим антителом. Процент лизиса наносили на график в зависимости от концентрации антител, а максимальный процент лизиса и значения EC50 рассчитывали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc; версия 8.1.0) и отображали в таблице 4. Результаты также показаны на фиг. 14.

Фиг. 14 демонстрирует, что mAb IgG1-B дикого типа против CD38 индуцировали лизис клеточных линий с высоким уровнем экспрессии CD38; SU-DHL-8, Oci-Ly-7, Oci-Ly-19, Ramos, Daudi, Oci-Ly-18 и Raji, но не для любой из других клеточных линий, которые экспрессируют меньше молекул CD38 на мембране. Введение мутации E430G в IgG1-B привело к более высокой КЗЦ при значительно более низкой концентрации антител на клеточных линиях, которые уже были чувствительны к IgG1-B дикого типа, и

привело к лизису дополнительных клеточных линий с более низким числом копий CD38, которые были нечувствительны к КЗЦ, индуцированной IgG1-B (например: DОНН2, SU-DHL-4, WSU-DLCL2, Z-138, JVM-13, RЕН, Jeko-1, Wien-133, 697, RS4;11, NALM-16 и JVM-3). Некоторые клеточные линии с очень низкой экспрессией CD38 (RC-K8 и Pfeiffer) или очень высокой экспрессией CD59 (DB и Granta-519) не показали лизиса при воздействии IgG1-B и IgG1-B-E430G. Практически на всех протестированных клеточных линиях антитело IgG1-C-E430G индуцировало лизис клеток при более низкой концентрации антител по сравнению с IgG1-B-E430G, тогда как IgG1-A-E430G индуцировало лизис при гораздо более высоких концентрациях антител. Это также отражено более высокими значениями EC50 для IgG1-A-E430G в таблице 4. Это демонстрирует, что CD38-mAb с мутацией E430G индуцируют более сильную КЗЦ по сравнению с CD38-антителами дикого типа и индуцируют КЗЦ опухолевых клеток с более низкими уровнями экспрессии CD38, в которых CD38-антитела дикого типа не индуцируют КЗЦ. Более того, способность CD38-антител с мутацией E430G индуцировать КЗЦ может различаться у разных клонов антител, нацеленных на CD38.

На фиг. 15 показана сводка некоторых значений EC50, представленных в таблице 4. Показаны значения EC50 для КЗЦ, индуцированной антителами IgG1-B, IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G на 20 различных опухолевых линиях В-клеток. Каждый квадрат, треугольник или круг представляет собой отдельную опухолевую В-клеточную линию. Значения EC50, полученные с клеточными линиями AML, не были включены, поскольку IgG1-B-E430G не тестировалось на клеточных линиях AML.

CDC под действием IgG1-C-E430G также оценивали на выборке клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML) (фиг. 16). Оценку проводили, как описано выше, для опухолевых линий В-клеток, с той лишь разницей, что это линия(ии) опухолевых клеток.

На фиг. 16 показано, что КЗЦ индуцировалась IgG1-C-E430G во всех клеточных линиях AML, экспрессирующих CD38, в то время как в CD38-отрицательных клеточных линиях AML КЗЦ не наблюдалось. КЗЦ под действием IgG1-C-E430G происходила при гораздо более низком значении EC50 по сравнению с IgG1-B, в то время как максимальный лизис клеток был выше для IgG1-C-E430G по сравнению с IgG1-B (таблица 4).

Кроме того, КЗЦ под действием IgG1-C-E430G оценивали на дополнительных клеточных линиях множественной миеломы (ММ) (фиг. 23). Эксперименты проводили, как описано выше для опухолевых линий В-клеток, с той лишь разницей, что это линия(ии) опухолевых клеток.

На фиг. 23 показано, что антитело IgG1-C-E430G индуцировало вплоть до 100%

лизиса клеток LP-1. По отношению к клеткам NCI-H929, которые имеют более низкие уровни экспрессии CD38, антитело IgG1-C-E430G индуцировало частичную КЗЦ, в то время как в 2 клеточных линиях MM, OPM-2 и ARH77, КЗЦ не наблюдалось. В 2 чувствительных клеточных линиях MM, КЗЦ, индуцированная под действием IgG1-C-E430G, происходила при более низком значении EC50 по сравнению с IgG1-B, в то время как максимальный лизис клеток был выше для IgG1-C-E430G по сравнению с IgG1-B в клеточной линии NCI-H929 (таблица 4).

Таблица 4 Максимальный лизис и значения EC50 лизиса

клеточная линия	IgG1-C-E430G			IgG1-B			IgG1-B-E430G			N
	EC50 мкг/мл	макс % лизиса	мин % лизиса	EC50 мкг/мл	макс % лизиса	мин % лизиса	EC50 мкг/мл	макс % лизиса	мин % лизиса	
SU-DHL-8	0,009	100,0	35,4	0,040	99,8	22,8	0,009	100,0	31,0	3
Oci-Ly-7	0,012	99,2	21,0	0,138	91,7	18,1	0,027	98,9	19,4	3
Oci-Ly-19	0,031	100,0	23,4	0,091	98,8	24,6	0,032	100,0	27,4	3
Ramos	0,013	99,5	25,0	0,108	94,0	17,1	0,020	99,3	19,4	3
Daudi	0,030	96,5	17,9	0,307	89,5	11,3	0,026	96,7	19,1	4
Oci-Ly18	0,057	92,5	24,5	0,212	83,3	17,3	0,088	92,3	18,8	3
Raji	0,036	83,8	18,4	0,171	65,8	18,6	0,088	87,1	17,8	4
DOHH2	0,115	50,3	19,2	0,874	29,4	19,4	0,399	49,7	20,9	3
SU-DHL-4	0,073	75,5	12,0	ND	23,5	12,5	0,165	76,6	11,8	3
WSU-DLCL2	0,345	65,9	6,3	ND	7,8	8,3	0,577	67,6	7,7	1
Z-138	0,106	41,2	20,6	4,327	28,1	19,5	0,190	38,0	21,2	1
JVM-13	0,146	43,6	13,3	0,769	30,5	13,3	0,458	44,5	13,3	3
REH	0,039	58,3	22,4	0,232	30,6	18,0	0,112	58,1	19,2	3
Jeko-1	0,108	61,6	5,5	0,833	13,2	9,3	0,302	51,5	8,1	2
Wien133	0,015	96,0	8,2	0,199	13,2	7,0	0,013	97,4	7,9	2
697	0,087	57,6	10,9	ND	ND	ND	0,308	65,6	11,1	3
Granta-519	ND	17,4	13,5	ND	15,5	77,8	ND	16,7	13,1	3
RS4;11	0,093	33,9	9,8	ND	14,1	9,9	0,328	29,9	10,1	3
DB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
NALM-16	0,022	60,9	10,1	0,193	16,2	9,4	0,075	58,6	9,7	3
JVM-3	0,110	42,5	11,6	0,245	19,0	12,8	0,287	40,2	12,2	2
U266	0,052	32,5	9,6	3,889	19,1	10,8	ND	ND	8,7	2
RC-K8	ND	ND	6,6	ND	7,7	ND	ND	8,2	8,6	1
Pfeiffer	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2
THP-1	0,075	81,5	12,6	0,051	42,4	6,1	NT	NT	NT	3
Oci-AML3	0,046	90,4	0,0	1,485	26,1	0,0	NT	NT	NT	3
monomac 6	0,093	83,9	14,0	0,053	54,1	0,0	NT	NT	NT	3
KG-1	0,104	77,7	0,0	1,401	26,2	2,0	NT	NT	NT	3
ML-2	0,023	99,6	5,1	0,414	95,4	0,0	NT	NT	NT	3
U937	0,057	68,6	0,0	0,140	34,3	0,0	NT	NT	NT	2
Nomo-1	0,039	95,9	6,7	1,937	28,4	1,9	NT	NT	NT	3
MEGAL	0,170	30,1	0,7	ND	ND	ND	NT	NT	NT	3
AML-193	0,032	89,5	0,8	ND	ND	ND	NT	NT	NT	2
MOLM-13	0,017	92,0	0,0	0,290	32,5	9,8	NT	NT	NT	3
HL-60	0,070	52,5	0,0	4,519	10,2	0,0	NT	NT	NT	3
Oci-M1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NT	NT	NT	1
LP-1	0,020	99,4	9,1	0,115	98,2	9,8	NT	NT	NT	3

NCI-H929	0,308	50,9	0,0	0,864	36,1	0,4	NT	NT	NT	3
OPM-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NT	NT	NT	3
ARH77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NT	NT	NT	3

ND = не определено; NT = не протестировано

Также определяли индукцию КЗЦ CD38-антителами дикого типа и мутантными по E430G с использованием регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки получали, как описано в Примере 8 (трогоцитоз CD38 из регуляторных Т-клеток), и тестировали в анализе КЗЦ, как описано выше для линий опухолевых клеток. Процент лизиса показан на фиг. 17 вместе со значениями EC50.

Фиг. 17 демонстрирует, что IgG1-B практически не индуцирует лизис регуляторных Т-клеток; в то время как IgG1-B-E430G и IgG1-C-E430G индуцировали лизис регуляторных Т-клеток, где антитело IgG1-C-E430G показало более низкое значение EC50 по сравнению с IgG1-B-E430G.

#### КЗЦ в цельной крови

Цельную кровь здорового донора собирали в пробирки с гирудином, чтобы предотвратить коагуляцию без нарушения физиологических уровней кальция (требуется для КЗЦ). 50 мкл/лунку вносили в 96-луночные планшеты для тканевых культур с плоским дном (Greiner bio-one). Антитела к CD38 и контрольные антитела серийно разбавляли в среде RPMI, содержащей 0,2% БСА (конечная концентрация антител 0,016–10 мкг/мл в 5-кратных серийных разведениях), добавляли по 50 мкл разведенных антител на лунку и инкубировали в течение ночи при 37°C. В качестве положительного контроля КЗЦ по отношению к В-клеткам тестировали CD20 Ab IgG1-7D8 с 60 мкг/мл экулизумаба и без него для блокирования КЗЦ. Клетки переносили в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, центрифугированные), центрифугировали (3 минуты, 1200 об/мин) и один раз промывали 150 мкл PBS (B.Braun) на лунку. Осадок клеток ресуспендировали в 80 мкл PBS с 1000-кратно разбавленным аминореактивным красителем для оценки жизнеспособности (BD, от англ. viability dye) и инкубировали 30 минут при 4°C. Затем клетки промывали 150 мкл PBS и инкубировали с 80 мкл PBS, содержащим коктейль антител, фенотипирующих лимфоциты (1:200 мышиных антител против человеческого CD3-EF450 [ОКТ3, ebioscience], 1:50 мышиных антител против человеческого CD19-BV711 [ОКТ3, ebioscience]. H1B19, Biolegend] и 1:100 мышиных антител против человеческого CD56-PE/CF594 [NCAM16.2, BD]) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали 150 мкл PBS и инкубировали 10 минут при 4°C со 150 мкл раствора для лизиса эритроцитов (10 mM KHCO<sub>3</sub> [Sigma], 0,01 mM EDTA [Fluka], 155 mM NH<sub>4</sub>Cl [Sigma], растворенного в 1 л H<sub>2</sub>O [B. Braun] и доведенного до pH 7,2). Клетки промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и

анализировали на FACS\_Fortessa (BD). Количество жизнеспособных NK-клеток (CD56pos, CD3neg и аминореактивный краситель для оценки жизнеспособности), Т-клеток (CD3pos и аминореактивный краситель для оценки жизнеспособности) и В-клеток (CD19pos и аминореактивный краситель для оценки жизнеспособности) показано на фиг. 5. Данные показаны от 1 репрезентативного донора из 5 протестированных.

На фиг. 5 показано, что CD38-антитела, содержащие мутацию E430G, индуцируют минимальную КЗЦ здоровых лимфоцитов крови. Положительный контроль CD20 Ab IgG1-7D8 демонстрировал специфическую КЗЦ CD20-положительных В-клеток, которые полностью блокировались ингибитором КЗЦ экулизумабом. Антитела IgG1 CD38 дикого типа не индуцировали КЗЦ В-, Т- и NK-клеток. Некоторую КЗЦ наблюдали в отношении NK-клеток после инкубации с клонами В и С, содержащими мутацию E430G (примерно 40% лизис NK-клеток при самой высокой концентрации с IgG1-B-E430G), но не в отношении В- и Т-клеток.

В целом, эти результаты показывают, что CD38-антитела с мутацией E430G обладают широкой КЗЦ-активностью в отношении ряда линий опухолевых клеток с вариабельной экспрессией CD38. CD38-антитела с мутацией E430G также были протестированы против лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, и было показано, что они индуцируют только до 40% лизиса NK-клеток. NK-клетки экспрессируют в среднем 15 000 CD38/клетку, что аналогично клеточной линии MM U266. Оба типа клеток в равной степени чувствительны к КЗЦ под действием CD38-антител с мутацией E430G, что указывает на то, что КЗЦ под действием CD38-антител с мутацией E430G коррелирует с экспрессией CD38. Без привязки к теории, можно сказать, что, на основании этих данных предполагается, что порог для КЗЦ под действием CD38-антител с мутацией E430G составляет около 15000 молекул CD38/клетку. В то время как большинство линий опухолевых клеток В-клеток экспрессируют более высокие уровни CD38 в диапазоне от 15 000 до 400 000 молекул CD38 на клетку, здоровые лимфоциты экспрессируют только 2 000-15 000 молекул CD38 на клетку, что делает эти клетки менее уязвимыми к КЗЦ под действием E430G CD38-антител.

*Пример 4. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) под действием CD38-антител с мутацией E430G*

Способность CD38-антител с мутацией E430G индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) определяли с помощью анализа высвобождения хрома. Клетки Daudi собирали ( $5 \times 10^6$  клеток/мл) в 2 мл культуральной среды (RPMI 1640 с добавлением 0,2% БСА), к которой добавляли 100 мкКи  $^{51}\text{Cr}$  (Chromium-51; PerkinElmer). Клетки инкубировали на водяной бане при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 часа при

встряхивании. После отмывания клеток (дважды в PBS, 1500 об/мин, 5 мин) клетки ресуспендировали в культуральной среде и подсчитывали методом исключения трипанового синего. Клетки разбавляли до плотности  $1 \times 10^5$  клеток/мл и пипеткой переносили в 96-луночные круглодонные титрационные микропланшеты (Greiner Bio-One) и добавляли 50 мкл серийных концентраций (0,005-10 мкг/мл конечных концентраций в 3-кратном разведения) CD38 или контрольного изотипического антитела, разведенных в культуральной среде. Клетки предварительно инкубировали с Ab при комнатной температуре (КТ) в течение 15 мин.

Тем временем мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здоровых добровольцев (Sanquin) выделяли из 45 мл свежезабранной крови с гепарином (лейкоцитарная пленка) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Bio Whittaker) в соответствии с инструкциями производителя. После ресуспендирования клеток в культуральной среде клетки подсчитывали методом исключения трипанового синего и разводили до плотности  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

После предварительной инкубации клеток-мишеней с Ab добавляли 50 мкл эффекторных клеток, в результате чего соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 100:1. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для определения максимального лизиса 50 мкл меченных <sup>51</sup>Cr клеток Daudi (5000 клеток) инкубировали со 100 мкл 5% Triton-X100; для определения спонтанного лизиса (фоновый лизис) 5 000 меченных <sup>51</sup>Cr клеток Daudi инкубировали в 150 мкл среды без каких-либо антител или эффекторных клеток. Уровень антитело-независимого лизиса клеток определяли инкубацией 5000 клеток Daudi с 500 000 PBMC без антитела. Планшеты центрифугировали (1200 об/мин, 10 мин) и 75 мкл надосадочной жидкости переносили в микропробирки, после чего подсчитывали высвободившийся <sup>51</sup>Cr с помощью гамма-счетчика. Процент опосредованного антителами лизиса рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ специфического лизиса} = \frac{(\text{имп./мин. образца} - \text{имп./мин. спонтанного лизиса})}{(\text{имп./мин. максимального лизиса} - \text{имп./мин. спонтанного лизиса})}$$
, где имп./мин. - это количество импульсов в минуту.

На фиг. 6 показано, что все CD38-антитела были способны индуцировать лизис Daudi, на что указывает повышенный лизис, наблюдаемый для CD38-антител по сравнению с изотипическим контролем (IgG1-b12-E430G). Уже при самой низкой концентрации антител был отмечен лизис клеток, что позволяет предположить, что антитела должны были быть дополнительно разбавлены, чтобы наблюдать эффект, зависящий от дозы. CD38-антитела, которые содержат мутацию E430G, показали более



низкий максимальный лизис по сравнению с антителами дикого типа.

Вышеуказанный анализ высвобождения хрома был повторен с моноклеарными клетками периферической крови разных здоровых добровольцев (эффекторные клетки) со следующими клетками-мишенями: Daudi, Wien-133, Granta 519 и MEC-2, а также с антителами IgG1-B-E430G, IgG1-B, IgG1-C-E430G, IgG1-C и IgG1-b12-E430G. Результаты представлены на фиг. 18.

На фиг. 18 показано, что все CD38-антитела были способны индуцировать лизис клеток Daudi, Wien-133, Granta 519 и MEC-2, на что указывает усиленный лизис, наблюдаемый для CD38-антител по сравнению с изотипическим контролем (IgG1-b12-E430G). В большинстве случаев наблюдался дозозависимый лизис клеток-мишеней, но наблюдались некоторые различия между разными донорами РВМС.

Способность CD38-антител индуцировать АЗКЦ далее оценивали с использованием люминесцентного репортерного биоанализа АЗКЦ (Promega, номер по каталогу G7018), который выявляет перекрестное связывание FcγRIIIa (CD16) в качестве заменителя для АЗКЦ. В качестве эффекторных клеток набор содержит человеческие Т-клетки Jurkat, сконструированные таким образом, чтобы они стабильно экспрессировали высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT), управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Вкратце, клетки Daudi или регуляторные Т-клетки (5000 клеток/лунку) высевали в 384-луночные белые планшеты Optiplate (Perkin Elmer) в буфере для анализа АЗКЦ [среда RPMI-1640 [(Lonza, № по каталогу BE12-115F) с добавлением 3,5% сыворотки с низким IgG] и инкубировали в течение 6 часов при 37°C/5%CO<sub>2</sub> в общем объеме 30 мкл, содержащем серию концентраций антител (конечные концентрации 0,5-250 нг/мл в 3,5-кратных разведениях) и размороженных эффекторных клеток АЗКЦ Bioassay. После доведения планшетов до комнатной температуры (КТ) в течение 15 минут добавляли 30 мкл реагента люциферазы Bio Glo Assay и планшеты инкубировали в течение 5 минут при КТ. Выработку люциферазы количественно определяли считыванием люминесценции на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Фоновые уровни определяли из лунок, в которые добавляли только клетки-мишени и антитела (без эффекторных клеток). В качестве отрицательного контроля использовали лунки, содержащие только клетки-мишени и эффекторные клетки (без антител).

На фиг. 7 приведены результаты, полученные с клетками Daudi, которые показывают, что CD38-антитела были высокоэффективны в индукции зависимо от дозы перекрестного связывания FcγRIIIa, как определено в репортерном анализе. Антитела к CD38, которые содержали мутацию E430G, демонстрировали более низкое максимальное

перекрестное связывание по сравнению с соответствующими антителами дикого типа, что соответствовало результатам, полученным для анализа высвобождения хрома.

На фиг. 19 приведены результаты, полученные с Т-регуляторными клетками, которые показывают, что CD38-антитела были высокоэффективны в индукции зависимого от дозы перекрестного связывания Fc $\gamma$ RIIIa, как определено в репортерном анализе. CD38-антитела, которые содержали мутацию E430G, демонстрировали более низкое максимальное перекрестное связывание по сравнению с соответствующими антителами дикого типа.

*Пример 5. Антителозависимый клеточный фагоцитоз (АКФ) под действием CD38-антител с мутацией E430G*

Оценка способности CD38-антител с мутацией E430G индуцировать антителозависимый клеточный фагоцитоз была адаптирована из Overdijk M.B. et al. mAbs 7:2,311-320. Макрофаги получали путем выделения РВМС от здоровых добровольцев (Sanquin) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Bio Whittaker) в соответствии с инструкциями производителя. Из РВМС моноциты выделяли посредством отрицательной селекции с использованием набора для выделения моноцитов человека Dynabeads Untouched (Invitrogen). Выделенные моноциты культивировали в течение 3 дней в бессывороточной среде дендритных клеток (CellGenix GmbH) с добавлением 50 нг/мл GM-CSF (Invitrogen), а затем в течение 2 дней в бессывороточной среде дендритных клеток с добавлением 100 нг/мл GM-CSF для индукции дифференцировки макрофагов. Дифференцированные макрофаги отделяли с помощью версена (Life Technologies) и клеточного соскоба и характеризовали методом проточной цитометрии для окрашивания CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) и CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Макрофаги высевали по 100 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты для культивирования с плоским дном (Greiner bio-one) и оставляли прикрепляться в течение ночи при 37°C в бессывороточной среде дендритных клеток с добавлением 100 нг/мл GM-CSF.

Клетки-мишени (Daudi) метили РКН-26 (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя, опсонизировали 10 мкг/мл CD38-антитела (30 минут при 4°C), трижды промывали FACS-буфером и добавляли к макрофагам при соотношении эффектор:мишень (Е:Т) 5:1. Планшет кратковременно центрифугировали со скоростью 300 об/мин, чтобы сблизить эффекторные клетки и клетки-мишени, и инкубировали 45 минут при 37°C. Затем макрофаги собирали с помощью версена и окрашивали CD14-BV605 (biolegend) и CD19-BV711 (biolegend). Фагоцитоз отображали как процент CD14-положительных макрофагов, которые также были положительными по РКН-26, но

отрицательными по CD19 (чтобы исключить макрофаги, которые присоединены только к клеткам Daudi), измеренный на проточном цитометре (BD).

На фиг. 8 показано, что все CD38-антитела были способны индуцировать АКФ клеток Daudi, на что указывает увеличенный процент макрофагов PKH-29pos, CD14pos и CD19neg, наблюдаемый для CD38-антител по сравнению с изотипическими контролями (IgG1-b12 и IgG1-b12-E430G). В зависимости от используемого донора CD38-антитела, содержащие мутацию E430G, показали более высокий процент макрофагов PKH-29pos, CD14pos и CD19neg по сравнению с антителами дикого типа, что указывает на то, что фагоцитоз, опосредованный CD38-Ab, может быть увеличен путем введения мутации E430G.

*Пример 6. Индукция апоптоза CD38-антителами линий опухолевых клеток*

Индукцию апоптоза CD38-антителами исследовали путем инкубации в течение ночи линий опухолевых клеток с CD38-антителом с последующим анализом живых/мертвых клеток на проточном цитометре. Клетки, ресуспендированные в RPMI, содержащем 0,2% БСА, высевали в количестве 100000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты для культивирования тканей с плоским дном (Greiner bio-one). Серийные разведения (конечная концентрация антител 0,01–10 мкг/мл в 4-кратных серийных разведениях) CD38 или контрольных антител добавляли в отсутствие или в присутствии 10 мкг/мл козьего антитела против IgG1 человека (Jackson) для обеспечения дополнительного перекрестного связывания Fc. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C, дважды промывали/центрифугировали с использованием буфера FACS (PBS/0,1% БСА/0,01% азида натрия) и ресуспендировали в буфере FACS с добавлением разбавленного 1:4000 Topro-3-iodine (Life Technologies). Жизнеспособность клеток анализировали на FACS\_Fortessa (BD) и отображали как процент апоптотических (положительных по Topro-3-iodine) клеток.

На фиг. 9 показано, что CD38-антитела дикого типа и мутантные антитела E430G не индуцировали апоптоз сами по себе, но добавление Fc-перекрестно-связывающего агента приводило к примерно 30% апоптоза. Никакой разницы между CD38-антителами дикого типа и мутантными антителами E430G не наблюдалось.

*Пример 7. Ингибирование ферментативной активности CD38 в отсутствие PVMC*

Ингибирование активности CD38-циклазы

CD38 представляет собой эктофермент, который превращает NAD в cADPR и ADPR. Эта активность зависит от присутствия H<sub>2</sub>O. Когда присутствует H<sub>2</sub>O, NAD превращается в ADPR (активность гликогидролазы), а cADPR превращается в ADPR

(активность гидролазы). Около 95% NAD превращается в ADPR за счет активности (глико)гидролазы. В отсутствие  $H_2O$  CD38 превращает NAD в cADPR, используя свою циклазную активность. Для измерения ингибирования активности фермента CD38 использовали производные NAD, которые становятся флуоресцентными после обработки CD38.

Фиг. 10 иллюстрирует ферментативную активность CD38.

Сначала измеряли ингибирование активности CD38-циклазы с использованием фосфодиэстеразы натриевой соли никотинамидгуанидинуклеотида (NGD, Sigma) в качестве субстрата для CD38. В качестве источника CD38 использовали линии опухолевых клеток с разным уровнем экспрессии CD38, а также рекомбинантный гистициновый внеклеточный домен CD38 (hisCD38). Опухолевые клетки (Daudi и Wien133) собирали и промывали 20 мМ Tris-HCL. Клетки ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCL и 200000 клеток/лунку высевали в 96-луночные белые непрозрачные планшеты (PerkinElmer) по 100 мкл/лунку. HisCD38 высевали в концентрации 0,6 мкг/мл в 100 мкл/лунку 20 мМ Tris-HCL. Антитела к CD38 разбавляли до 100 мкг/мл в 20 мМ Tris-HCL, добавляли 10 мкл к клеткам и hisCD38 (конечная концентрация 9 мкг/мл) и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Контрольные лунки инкубировали с антителом b12 вместо CD38-антитела или вообще без антитела. Затем в планшет добавляли 10 мкл (80 мкМ) NGD, разведенного в 20 мМ Tris-HCL, и сразу же измеряли флуоресценцию с помощью многоканального ридера Envision (PerkinElmer) с использованием возбуждения 340 нм и эмиссии 430 нм. Преобразование NGD отслеживали в реальном времени путем измерения флуоресценции в указанные моменты времени на фиг. 11 до тех пор, пока не было достигнуто плато. Для hisCD38 флуоресценцию измеряли каждые 3 минуты в течение 27 минут, для клеток Daudi флуоресценцию измеряли через 5, 15, 30, 60, 120 и 185 минут, а для Wien133 флуоресценцию измеряли через 5, 15, 30, 60, 150, 220, 300 и 360 минут. Ингибирование активности CD38-циклазы выражали как процентное ингибирование по сравнению с контролем, где контроль представляет собой образец с hisCD38 и NGD, но без Ab. Для каждого тестируемого состояния показан один репрезентативный эксперимент.

На фиг. 11А показано, что NGD быстро преобразовывался благодаря активности hisCD38-циклазы. Конверсия была завершена примерно через 9 минут. В присутствии CD38 Ab В максимальный процент конверсии NGD снижался на ~25%, в присутствии CD38 Ab С максимальный процент конверсии NGD снижался на ~50%, тогда как CD38 Ab А не влиял на общий кругооборот NGD. На ингибирование активности CD38-циклазы не влияло наличие мутации E430G. Аналогичные результаты видны на фиг. 11В и 11С, где

измеряли конверсию NGD с помощью CD38, присутствующего на клетках Daudi и Wien133. Кинетика преобразования NGD была немного медленнее на клетках Daudi и особенно на клетках Wien133, что, вероятно, коррелирует с присутствием меньшего количества молекул CD38. Тем не менее, 25% ингибирование активности CD38-циклазы индуцировалось Ab B (ингибирование ~25%) и ~40% ингибирование активности CD38-циклазы индуцировалось Ab C, в то время как Ab A не проявляло эффекта. Антитела дикого типа и антитела с мутацией E430G показали сходные результаты, указывая на то, что мутация E430G не влияет на опосредованное антителами ингибирование активности циклазы CD38.

*Пример 8. Антителозависимый трогоцитоз под действием CD38-антител с мутацией E430G*

#### Трогоцитоз под действием CD38-антител с мутацией E430G на клетках Daudi

Оценивали способность CD38-антител с мутацией E430G индуцировать трогоцитоз на клетках Daudi. Макрофаги получали путем выделения PBMC здоровых добровольцев (Sanquin) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Bio Whittaker) в соответствии с инструкциями производителя. Из PBMC моноциты выделяли посредством отрицательной селекции с использованием набора для выделения моноцитов человека Dynabeads Untouched (Invitrogen). Выделенные моноциты культивировали в течение 3 дней в бессывороточной среде дендритных клеток (CellGenix GmbH) с добавлением 50 нг/мл GM-CSF (Invitrogen), а затем в течение 2 дней в бессывороточной среде дендритных клеток с добавлением 100 нг/мл GM-CSF для индукции дифференцировки макрофагов. Дифференцированные макрофаги отделяли с помощью версена (Life Technologies) и клеточного соскоба и характеризовали методом проточной цитометрии для окрашивания CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) и CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Макрофаги высевали по 100 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты для культивирования с плоским дном (Greiner bio-one) и оставляли прикрепляться в течение ночи при 37°C в бессывороточной среде для дендритных клеток с добавлением 100 нг/мл GM-CSF.

Клетки-мишени (Daudi) метили PKH-26 (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя, опсонизировали 10 мкг/мл CD38-антитела (30 минут при 4°C), трижды промывали FACS-буфером и добавляли к макрофагам в соотношении эффектор:мишень (E:T) 5:1. Планшет кратковременно центрифугировали со скоростью 300 об/мин, чтобы сблизить эффекторные клетки и клетки-мишени, и инкубировали в течение 45 минут при 37°C.

На фиг. 21 показана схема анализа, используемая для измерения трогоцитоза.

Экспрессию CD38 и окрашивание человеческого IgG определяли на клетках Daudi путем инкубации с клоном А CD38, конъюгированным с FITC, и козьим антителом против IgG человека-FITC (Southern Biotech), соответственно. CD38 клон А использовали для окрашивания CD38, поскольку это Ab распознает неперекрывающийся эпитоп на CD38 по сравнению с клонами В и С.

На фиг. 12 показано, что экспрессия CD38 на клетках Daudi была значительно снижена после 45-минутного совместного культивирования с макрофагами и CD38-антителами. Снижение экспрессии CD38 было самым сильным с CD38-антителами с мутацией E430G. Та же тенденция наблюдалась для окрашивания человеческого IgG на опсонизированных антителами клетках Daudi.

#### Трогоцитоз под действием CD38-антител с мутацией E430G на регуляторных Т-клетках

Регуляторные Т-клетки (Treg) с высокой экспрессией CD38 обладают большей иммуносупрессивной активностью по сравнению с Treg со средней экспрессией CD38 (Krejčík J. et al. Blood 2016 128:384-394). Следовательно, стратегии снижения экспрессии CD38 на Treg могут уменьшить иммуносупрессивное действие этих клеток. Авторы исследовали, могут ли CD38-антитела с мутацией E430G снижать экспрессию CD38 на Treg посредством трогоцитоза. Treg выделяли из PBMC здоровых добровольцев (Sanquin) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Bio Whittaker) в соответствии с инструкциями производителя. Из PBMC CD4<sup>+</sup> Т-клетки выделяли посредством отрицательной селекции с последующим обогащением CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток с использованием набора для выделения Treg (Miltenyi) в соответствии с инструкциями производителя. Затем Treg размножали до  $5 \times 10^4$  клеток/мл в бессывороточной среде для дендритных клеток с добавлением 5% человеческой сыворотки (Sigma), 1000 ед/мл IL-2 (peprotech), 100 нг/мл рапамицина (Sigma) и гранул, покрытых CD3/CD28 (Gibco), при соотношении гранула:клетка 4:1 в течение 20 дней при 37°C. Каждые 3-4 дня плотность клеток доводили до  $5 \times 10^5$  клеток/мл с использованием бессывороточной среды для дендритных клеток с добавлением 1000 ед/мл IL-2 и 100 нг/мл рапамицина. Фенотип регуляторных Т-клеток отслеживали с течением времени с помощью окрашивания методом проточной цитометрии следующими антителами: CCR7-BV785 (Biolegend), CD62L-FITC (BD), CD4-APC/efluor780 (e-biosciences), CD25-PerCP/Cy5 (Biolegend), Foxp3-PE/CF594 (BD), CTLA4-efluor660 (e-biosciences), CD127-PE/CY7 и CD38-GV605 (Biolegend).

Для оценки индуцированного Ab трогоцитоза CD38 из Treg, Treg (клетки-мишени) совместно культивировали с PBMC (эффektorными клетками) и экспрессию CD38

отслеживали на Treg. Вкратце: PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок (Sanquin) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Bio Whittaker) в соответствии с инструкциями производителя и высевали в среду RPMI-1640 (Lonza) с добавлением 0,2% БСА при плотности  $5 \times 10^5$  клеток на лунку и культивировали 3 дня, чтобы моноциты прикрепилась. Treg метили 0,25 мкМ красителя CellTrace far red (CTFR) в соответствии с инструкциями производителя и предварительно инкубировали с CD38 Ab с мутацией E430G в течение 10 минут при 37°C. Treg промывали и  $1 \times 10^5$  Ab-опсонизированных клеток на лунку переносили на планшет с PBMC. PBMC и Treg кратковременно центрифугировали при 300 об/мин, чтобы сблизить клетки, и инкубировали в течение 23 часов при 37°C. Трогоценитоз CD38 измеряли путем анализа экспрессии CD38 с помощью FITC-конъюгированного клона CD38 А на CTFR-положительных Treg с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 13 показано, что экспрессия CD38 на регуляторных Т-клетках снижалась после инкубации с CD38-антителами с мутацией E430G и PBMC. Без PBMC не наблюдалось снижения экспрессии CD38 на регуляторных Т-клетках, что убедительно свидетельствует о трогенизации. Кроме того, в присутствии PBMC антитело IgG1-B не индуцировало трогенизацию CD38, в то время как сильное снижение экспрессии CD38 индуцировалось антителами В и С с мутацией E430G. Это позволяет предположить, что CD38-антитела с мутацией E430G индуцируют повышенный трогенизацию CD38.

*Пример 9. Противоопухолевая активность CD38-антитела С с мутацией E430G на моделях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, полученной от пациента*

Полученные от пациента клетки диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) инокулировали подкожно мышам CB17.SCID и лечение антителами (2 еженедельные дозы 5 мг/кг IgG1-C-E430G, вводимые внутривенно; PBS использовали в качестве отрицательного контроля) начинали, когда опухоли достигали среднего объема примерно 150-250 мм<sup>3</sup>. Объемы опухоли определяли в двух измерениях с помощью штангенциркуля и выражали в мм<sup>3</sup> по формуле:  $V = (L \times W \times W)/2$ , где V - объем опухоли, L - длина опухоли (самый длинный размер опухоли) и W - ширина опухоли (самый длинный размер опухоли, перпендикулярный L). Объемы опухоли представлены в зависимости от времени на фиг. 20. Каждая группа, получавшая лечение, состоит из одной мыши. Для расчета значения отклика использовалась следующая формула; (объем опухоли мыши, получавшей IgG1-C-E430G, в день X - объем опухоли мыши, получавшей IgG1-C-E430G, в день 0) / (объем опухоли контрольной мыши в день X - объем опухоли контрольной мыши в день 0).

X = последний день в период между 7 и 25 днем, когда оба животных были живы и

было проведено измерение опухоли.

Значения ответа, а также экспрессия мРНК CD38 приведены в таблице 5. Модели с самыми высокими уровнями мРНК CD38 также продемонстрировали наилучший ответ. Это также видно из графиков на фиг. 20. Таким образом, две еженедельные дозы IgG1-C-E430G снижали рост опухоли в двух из пяти протестированных моделей DLBCL PDX, которые имели самую высокую экспрессию мРНК CD38.

Таблица 5 Обзор экспрессии мРНК CD38 и рассчитанное значение ответа для пяти моделей DLBCL PDX. Низкое значение ответа указывает на регрессию опухоли

Модель	CD38 (определенное с помощью RNASeq: $\log_2$ (TPM value + 1))	Ответ ( $\Delta T/\Delta C$ )	Ответ, подсчитанный за день;
Ly12638	6,427	-11%	15
Ly11212	6,066	-2%	11
Ly13976	6,017	54%	13
Ly13693	4,796	58%	22
Ly14862	0	83%	11

*Пример 10. Антитело IgG1-C-E430G индуцирует сильную опосредованную компонентом цитотоксичность в мононуклеарных клетках костного мозга пациентов с недавно диагностированной ММ*

Мононуклеарные клетки костного мозга (BM-MNC) выделяли с помощью градиента плотности Ficoll-Нураque из полных аспиринов костного мозга от 3 недавно диагностированных пациентов с ММ и 1 пациента с рецидивирующей/рефрактерной ММ и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования. В день использования BM-MNC размораживали, подсчитывали жизнеспособные клетки и высевали в 96-луночные планшеты. Клетки инкубировали с серийными разведениями (0,01–10 мкг/мл) IgG1-C-E430G или Darzalex® в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере для планшетов. В качестве отрицательного контроля клетки не обрабатывали или инкубировали с 10 мкг/мл IgG1-b12. В качестве источника компонента за 45 минут до измерения FACS добавляли 20% нормальную человеческую сыворотку, в которой в качестве константы определяли абсолютное количество клеток с использованием подсчета гранул с помощью проточной цитометрии. Для определения общего процента лизиса необработанные контрольные лунки использовали в качестве контрольных значений. Процент лизиса клеток множественной миеломы определяли по отношению к контролям с использованием следующего уравнения:

$\% \text{ лизиса клеток} = (1 - (\text{количество выживших клеток в образцах, обработанных антителами} / \text{количество выживших клеток в необработанных контролях})) \times 100\%$

На фиг. 22 А и В показано, что антитело IgG1-C-E430G индуцировало более высокие уровни лизиса в двух образцах BM-MNC от пациентов с недавно диагностированной ММ по сравнению с Darzalex®. Максимальный лизис,



индуцированный IgG1-C-E430G, находился в диапазоне 84-90% по сравнению с максимальным лизисом в диапазоне 31-55%, индуцированным Darzalex®. В двух других образцах BM-MNC, у одного из пациентов с рецидивирующей/рефрактерной MM, который не получал Darzalex® в рамках предшествующей терапии (фиг. 22C), и у одного из пациентов с недавно диагностированной MM (фиг. 22D), не было отмечено индукции КЗЦ с помощью антитела IgG-C-E430G или Darzalex® (фиг. 22C и D).

#### *Пример 11. Препараты антитела*

Были проведены исследования для оценки влияния буфера, pH раствора и эксципиентов на белковую стабильность антитела IgG1-C-E430G. IgG1-C-E430G с VH, содержащей SEQ ID NO:1, VL, содержащей SEQ ID NO:5, CH, содержащей SEQ ID NO:46, и CL, содержащей SEQ ID NO:37, экспрессированного в клетках CHO.

#### Методы

Биофизическое исследование:

В биофизическом исследовании оценивали IgG1-C-E430G (2 мг/мл) в различных комбинациях буфер/наполнитель/pH. Для исследования были приготовлены два типа буфера (ацетатный и гистидиновый) с pH от 5,5 до 6,5 с четырьмя типами эксципиентов (NaCl, аргинин, сахароза, сорбит) (таблица 5).

Термическую и конформационную стабильность IgG1-C-E430G оценивали с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), а профиль агрегации и размер частиц определяли с помощью динамического светорассеяния (DLS).

Таблица 5. Препараты для биофизических исследований (BS)

BS ID	Состав	Эксципиент	pH
F1	20 mM Ацетат	-	5,5
F2		NaCl	5,5
F3		Аргинин	5,5
F4		Сорбитол	5,5
F5		Сахароза	5,5
F6	20 mM Гистидин	-	5,5
F7		NaCl	5,5
F8		Аргинин	5,5
F9		Сорбитол	5,5
F10		Сахароза	5,5
F11		-	6,0
F12		NaCl	6,0
F13		Аргинин	6,0
F14		Сорбитол	6,0
F15		Сахароза	6,0
F16		-	6,5

Исследование физического стресса и влияния поверхностно-активных веществ:

После биофизического исследования были оценены 6 выбранных препаратов для определения защиты, обеспечиваемой во время циклов замораживания-оттаивания и

перемешивания IgG1-C-E430G. Влияние поверхностно-активного вещества в препарате также оценивали путем добавления полисорбата 80 (PS80) в каждый из 6 препаратов, в результате чего было получено всего 12 препаратов для оценки (таблица 6).

Проводили замену буфера в 6 препаратах IgG1-C-E430G путем фильтрации центрифугированием и осуществляли либо пять циклов замораживания-оттаивания, либо 48-часовое перемешивание на настольном шейкере для планшетов при 400 об/мин. Третий набор образцов, выдержанных на столе в течение 48 часов при комнатной температуре, использовали в качестве контроля. В случае препаратов с поверхностно-активными веществами, их добавляли PS80 после замены буфера.

Образцы анализировали с использованием следующих аналитических методов: внешний вид, эксклюзионная хроматография (SEC), A<sub>280</sub>, DLS и A<sub>550</sub>.

Таблица 6. Препараты для исследования физического стресса (PSS)

PSS ID	Состав	Эксцепиент	pH	% PS80
F2	20 mM Ацетат	NaCl	5,5	-
F5		Сахароза	5,5	-
F11	20 mM Гистидин	-	6,0	-
F12		NaCl	6,0	-
F14		Сорбитол	6,0	-
F15		Сахароза	6,0	-
F2	20 mM Ацетат	NaCl	5,5	0,04%
F5		Сахароза	5,5	0,04%
F11	20 mM Гистидин	-	6,0	0,04%
F12		NaCl	6,0	0,04%
F14		Сорбитол	6,0	0,04%
F15		Сахароза	6,0	0,04%

Исследование стабильности:

Препарат, показанный в таблице 7, был выбран для оценки IgG1-C-E430G в концентрации 20 мг/мл при номинальной температуре (2-8°C) и в условиях, ускоряющих разрушение препарата (25°C/60%RH (RH) и 40°C/75%RH) вплоть до 12 недель. Чтобы подтвердить качество продукта оптимальной рецептуры после физического стресса, в начальных условиях один дополнительный образец подвергся пяти циклам замораживания-оттаивания, а один образец подвергся перемешиванию (48 часов при 400 об/мин).

Использовали следующие аналитические методы: внешний вид, определение pH; A<sub>280</sub> (один повтор), SEC, визуализация капиллярной изоэлектрической фокусировки (icIEF), а также капиллярный электрофорез в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Таблица 7. Препараты для исследования стабильности

Конц. антитела (мг/мл)	Состав	Экспециент	pH	ПАВ
20	20 mM Гистидин	250 mM сорбитол	6.0	0,04% PS80

#### Аналитические методы

##### Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF):

Анализ DSF использует усиленный тепловой стресс для того, чтобы вызвать разворачивание белка для оценки термической и коллоидной стабильности. Переходы в развернутое состояние, вызванные повышенным тепловым стрессом, обнаруживаются по изменениям собственной флуоресценции белка из-за воздействия скрытых гидрофобных остатков при изменении условий окружающей среды. Когда остатки триптофана подвергаются воздействию, максимальная длина волны излучения смещается в сторону более длинных длин волн. Барицентрическое среднее (BCM), длина волны, при которой спектр излучения флуоресценции делится поровну, нанесено на график, показывающий конформационное изменение белка в зависимости от температуры. Анализ DSF обеспечивает значения температуры начала разворачивания ( $T_{onset}$ ) и температуры плавления ( $T_m$ ), которые получаются из кривых BCM.  $T_{onset}$  обеспечивает расчетную температуру, при которой белок начинает разворачиваться. Значение  $T_m$  представляет собой рассчитанную среднюю точку перехода белка из свернутого состояния в развернутое, зависящую от температуры.

Во время анализа DSF измерения статического светорассеяния (SLS) определяются при 266 нм и 473 нм для оценки коллоидной стабильности белка. Интенсивность статического рассеяния света от лазеров, используемых для освещения образца, пропорциональна наличию частиц того же порядка, что и падающий свет. Таким образом, этот анализ чувствителен к агрегации белков при изменении температуры. Статическое светорассеяние измеряют при 266 нм для обнаружения меньших размеров частиц агрегатов, а также при 473 нм для обнаружения более крупных агрегатов. Из этих данных определяют температуру начала агрегации ( $T_{agg}$ ), которая представляет собой температуру, при которой белок начинает агрегировать. Эти данные лучше всего анализировать по большим изменениям в интенсивности единиц счета — более высокие значения единиц счета указывают на то, что больше света было рассеяно из-за ассоциации белковых агрегатов. При повышении температуры изменения количества SLS по шкале 103, как правило, связаны со значительной агрегацией белка, минимальные изменения количества SLS связаны с частичной агрегацией, а отсутствие изменений количества SLS при изменении температуры свидетельствует о незначительной агрегации белка.

### Динамическое рассеяние света (DLS):

Анализ DLS оценивает размер белка и его агрегацию при комнатной температуре. Для анализа DLS определяются временные автокорреляционные функции рассеянного света, и предполагается один размер частиц с одной экспоненциальной кумулятивной аппроксимацией данных. Кумулятивные аппроксимации используются для определения распределения частиц по размерам в растворе. Отчетными значениями являются полидисперсность и гидродинамический радиус (диаметр). Для образцов белка, состоящих из одного распределения мономера, образец считается монодисперсным, однако для образцов, содержащих популяции частиц разного размера, образцы считаются полидисперсными. Индекс полидисперсности является мерой ширины распределения частиц по размерам: чем выше индекс полидисперсности, тем шире распределение частиц. Следовательно, образцы с высоким PDI обычно содержат полимеры более высокого порядка или крупные агрегаты. Гидродинамический радиус несферической белковой частицы — это диаметр сферы, имеющей ту же скорость поступательной диффузии, что и частица. Коэффициент диффузии зависит от молекулярной массы частицы, структуры поверхности, а также концентрации и типа ионов в составе. Большой гидродинамический радиус в монодисперсном распределении по размерам можно объяснить наличием в растворе олигомеров более высокого порядка (например, тетрамеров), но не крупных агрегатов.

Для настоящего анализа данные DSF и DLS для каждого образца были собраны в одном цикле на приборе Uncle (Unchained Labs). Вкратце, образцы раствора антитела с концентрацией 2 мг/мл (разбавленного в соответствующем буфере для состава) анализировали, как правило, по 48 образцов за прогон. Данные DLS были собраны при самой низкой температуре, обычно 25°C. Затем для данных DFS запускается линейное изменение температуры, обычно со скоростью 1°C/мин, и непрерывно измеряется флуоресценция для каждого образца на протяжении всего линейного изменения температуры.

### Визуальный внешний вид:

Образцы антител уравнивали до комнатной температуры. Стеклообразные флаконы проверяли, чтобы убедиться, что они чистые и не имеют царапин или инородных тел. Если применимо, 1 мл образца переносили в соответствующий стеклянный флакон. Для сравнения использовали 1 мл воды в аналогичном стеклянном флаконе. Внешний вид оценивали на чистом бело-черном фоне при окружающем лабораторном освещении. Цвет оценивали на белом фоне по сравнению с водой. Прозрачность оценивали по сравнению с водой на белом и черном фоне. Твердые частицы оценивали путем осторожного

переворачивания флакона, убеждаясь, что пузырьки воздуха не появляются, а затем наблюдая в течение ~ 5 секунд перед бело-черным фоном.

pH:

Образцы уравнивали до комнатной температуры. Обычно 100–250 мкл образца переносили в пробирку для измерения pH при 23–27°C. Зонд pH погружали в образец и измеряли pH. Датчики pH калибровали ежедневно.

Концентрация белка по УФ  $A_{280}$ :

Концентрацию белка определяли с использованием спектрофотометра в УФ/видимом свете (Agilent или эквивалентной системы) путем измерения светопоглощения образца при 280 нм ( $A_{280}$ ), используя 320 нм ( $A_{320}$ ) в качестве референсной длины волны. Образцы разводили примерно до 0,6 мг/мл с использованием буфера для разведения (12,6 mM одноосновного фосфата натрия, 140 mM хлорида натрия, pH 7,3) и переносили в одноразовые кюветы UVette (Eppendorf). Проводили измерение на спектрофотометре холостой пробы в виде буфера для состава, а затем измеряли оптическую плотность для всех длин волн в диапазоне от 240 до 400 нм для холостой пробы и подготовленных образцов. Результаты для  $A_{280}$  и  $A_{320}$  использовали для определения концентрации общего белка с использованием закона Бэра-Ламберта.

Мутность по  $A_{550}$

Мутность определяли с помощью спектрофотометра UV/Vis (Agilent 8453 или 8454 или эквивалентной системы) путем измерения светопоглощения образца при 550 нм без коррекции фона в кювете диаметром 1 см (одноразовая кювета UVette; Eppendorf) с неразбавленным материалом.

Эксклюзионная хроматография по размеру (SEC)

SEC использовали для оценки исходной чистоты лекарственного продукта, а также степени фрагментации, наблюдаемой для частиц с низкой молекулярной массой (LMW), и агрегации, наблюдаемой для частиц с высокой молекулярной массой (HMW). Относительные площади пиков на хроматограмме, полученной с помощью DAD, использовали для определения чистоты мономера по отношению к (HMW) частицам, которые элюируются перед мономером, и (LMW) частицам, которые элюируются после мономера. Результаты, представленные для этого способа, представляют собой % чистоты мономера, общее количество всех пиков, элюированных до мономера, в виде % от общего количества HMW, общее количество всех пиков, элюированных после мономера, выраженное как % от общего количества LMW, и общее количество всех немномеров представлено в виде % от общего количества примесей.

Оценку чистоты методом SEC проводили с использованием системы

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Agilent серии 1100/1200 или эквивалентной) с использованием 100 мМ фосфата натрия, 100 мМ сульфата натрия, подвижной фазы рН 6,8 и колонки с неподвижной фазой TOSOH TSK-gel G3000SWxl (7,8 x 300 мм) (Sigma). Пробоподготовка заключалась в разбавлении подвижной фазы до 1,0 мг/мл. Параметры прибора включали объем вводимого образца 50 мкл (50 мкг загрузки), скорость потока 1,0 мл/мин, температуру колонки 27,5°C, температуру автоматического пробоотборника 5±3°C и время анализа образца 20 минут. Данные собирали при длине волны 280 нм с полосой пропускания 8 нм с использованием детектора с диодной матрицей (DAD).

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детекцией непосредственно в капилляре (icIEF)

Для определения неоднородности заряда и изоэлектрической точки образцов антител применяли капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детекцией непосредственно в капилляре. icIEF обнаруживает сфокусированные белковые зоны с помощью полнокапиллярного УФ-детектора. Во время разделения icIEF напряжение подается на покрытый капилляр, заполненный образцом, маркерами pI (изоэлектрическая точка), метилцеллюлозой и амфолитами-носителями, что позволяет разделить виды белков в соответствии с их pI. Разделительный капилляр соединен с входным и выходным капиллярами с помощью половолоконных мембран, расположенных в анодном (кислотном) и катодном (основном) резервуарах. Это обеспечивает электрическую связь между резервуарами и внутренним объемом разделительного капилляра. Высокое напряжение, подаваемое на резервуары, позволяет проводить разделение видов белков на основе заряда. Этот способ используется для наблюдения за изменениями в неоднородности заряда антитела в составе из-за химических изменений, таких как дезамидирование, в ходе исследования стабильности.

Полученная электрофореграмма (поглощение в зависимости от рН), полученная в конце разделения, используется для получения результатов неоднородности заряда на основе процентной доли относительной площади для каждого пика по сравнению с общей площадью. Результаты, представленные для этого способа, включают % основного пика, % общего количества кислых вариантов (варианты с pI ниже основного пика) и % общего количества основных вариантов (варианты с pI выше основного пика). Кроме того, два белковых маркера с известными значениями pI используются для определения pI для каждого пика, и указывается pI основного пика.

В анализе использовали картридж cIEF и набор для химического анализа Maurice cIEF от ProteinSimple. Образцы и референсный стандарт разводили до концентрации 3

мг/мл в очищенной воде (MilliQ или эквивалент). Мастер-микс готовили в соответствии со списком компонентов, показанным ниже, с формулой, масштабированной для приготовления объема, достаточного для всех образцов:

Компонент	Объем (мкл)	Конечная композиция
1% метилцеллюлоза	35	0,35% (об./об.)
8 М мочевины	40	3 М
Pharmalyte 8-10.5 (GE Healthcare)	6	6,0% (об./об.)
Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare)	2	2,0% (об./об.)
6.14 маркер pI (ProteinSimple)	0,5	0,01% (об./об.)
10.10 маркер pI (ProteinSimple)	0,5	0,01% (об./об.)
Вода MilliQ	6	N/A
Всего	90	

Затем образец разбавляли до конечной концентрации (0,3 мг/мл) путем объединения 10 мкл образца с 90 мкл мастер-микса. Также готовили холостую пробу, используя 10 мкл воды вместо образца. Стандарт пригодности системы Maugice cIEF из тестового набора был подготовлен в соответствии с инструкциями производителя. Затем все препараты переносили в два 96-луночных планшета Maugice в следующем порядке: пригодность системы, контрольный образец, референсный стандарт, препараты образцов. Подготовка флакона с буфером состояла из приготовления флакона ProteinSimple с крышкой на 2 мл, содержащего 0,5 мл калибровочного стандарта флуоресценции, 2 мл воды MilliQ, 2 мл 0,5% метилцеллюлозы и пустого флакона, а также флакона с 2 мл воды MilliQ и прозрачного винтовой крышкой. Затем эти флаконы загружали в прибор в соответствии с описанием в программном обеспечении. Картридж был подготовлен путем загрузки 2 мл католита в красный порт и 2 мл анолита в белый порт.

#### Капиллярный электрофорез (CE)

При CE белковые частицы разделяются путем миграции через гель под действием электрического поля. Гель содержит сшитую полимерную сеть, которая действует как молекулярное сито, при этом более мелкие молекулы быстрее перемещаются через гель.

SDS используется для разворачивания белков и нанесения равномерного заряда, чтобы обеспечить миграцию в электрическом поле. Восстановитель (DTT) добавляется для разрушения дисульфидных связей. Краситель Protein Express Dye связывается с белком и флуоресцирует при воздействии интенсивного света, который обнаруживается прибором, когда фрагменты проходят через датчик.

#### Капиллярный электрофорез с уменьшенным микрочипом (R CE-SDS)

Результаты определяются путем сравнения относительных площадей каждого представляющего интерес пика с общей площадью всех пиков. Сообщаемые результаты представляют собой % легкой цепи (% LC), % тяжелой цепи (% HC), % негликозилированной тяжелой цепи (% NGHC), % чистоты (% LC + % HC) и % общего

количества сопутствующих веществ/примесей (сумма всех пиков, исключая % LC и % HC).

В анализе использовались система Caliper Lab Chip CXII, лабораторный чип Protein Express Assay Lab Chip и набор реагентов Caliper Protein Express Reagent, все от Perkin Elmer, для проведения оценки чистоты методом Lab on a Chip (LoC). Капиллярный электрофорез додецилсульфата натрия (CE- SDS), используя дитиотреитол (DTT) в качестве восстановителя. Образцы и эталонный стандарт разводили до концентрации 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) с pH 7,4. Восстанавливающий рабочий раствор готовили путем разбавления 24,5 мкл 1М DTT в 700 мкл буфера для экспресс-образцов HT Protein до конечной концентрации 33,8 мМ. Образцы восстанавливали путем объединения 5 мкл разведенного образца с 7 мкл восстанавливающего рабочего раствора в микроцентрифужной пробирке с последующим центрифугированием при 3000 x g в течение 1 минуты и нагреванием при  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3 минут на нагревательном блоке. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры с последующим центрифугированием при 3000 g в течение 1 минуты. Затем препараты образцов разбавляли 32 мкл воды MilliQ и переносили в 96-луночный планшет. Холостую пробу готовили с использованием 5 мкл PBS pH 7,4 и той же процедуры подготовки образца, чтобы гарантировать отсутствие мешающих пиков.

Приготовление чипа проводили путем добавления реагентов в лабораторный чип. Смесь гель-краситель готовили путем добавления 18 мкл раствора HT Protein Express Dye Solution к 520 мкл HT Protein Express Gel Matrix с последующим центрифугированием в предоставленных центрифужных фильтрах при 9300 g в течение 5 минут. Раствор для обесцвечивания готовили путем добавления 250 мкл гелевой матрицы HT Protein Express Gel Matrix в спиновый фильтр с последующим центрифугированием при 9300 g в течение 5 минут. Лэддер (HT Express Ladder) готовили путем нагревания 12 мкл при  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 5 минут на нагревательном блоке с последующим охлаждением и добавлением 120 мкл воды MilliQ. Лэддер переносили в пробирку для ПЦР на 0,2 мл и загружали в указанное место в приборе. Подготовка чипа достаточна для прогона 96-луночного планшета. Чип и планшет для образцов загружали в прибор, и анализировали образцы.

*Капиллярный электрофорез в микрочипе в невосстанавливающих условиях (NR CE-SDS)*

Результаты определяются путем сравнения относительных площадей каждого представляющего интерес пика с общей площадью всех пиков. Представленные результаты представляют собой % чистоты основного пика, % родственных веществ/примесей на передней стороне (пики с молекулярной массой ниже, чем у



основного пика), % родственных веществ/примесей на обратной стороне (пики с молекулярными массами выше основного пика) и % общего количества родственных веществ/примесей (%TRS/I).

В анализе использовали систему Perkin Elmer Caliper Lab Chip CXII, лабораторный чип Protein Express Assay Lab Chip и набор реагентов Caliper Protein Express Reagent для оценки чистоты с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия (CE-SDS) в системе Lab on Chip (LoC). Образцы и референсный стандарт разводили до концентрации 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) с pH 7,4. Невосстанавливающий рабочий раствор готовили путем разбавления 122,5 мкл йодацетамида (IAM) в 3500 мкл буфера для образцов HT Protein Express до конечной концентрации 8,5 мМ. Образцы готовили путем объединения 5 мкл разведенного образца с 7 мкл восстанавливающего рабочего раствора в микроцентрифужной пробирке с последующим центрифугированием при 3000 x g в течение 1 минуты и нагреванием при  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3 минут на нагревательном блоке. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры с последующим центрифугированием при 3000 g в течение 1 минуты. Затем препараты образцов разбавляли 32 мкл воды и переносили в 96-луночный планшет. Холостую пробу были готовили с использованием 5 мкл PBS pH 7,4 и той же процедуры подготовки образца, чтобы гарантировать отсутствие мешающих пиков. См. R CE-SDS выше для подготовки чипа.

В первом исследовании стабильности (Пример 11) подготовку образца для CE-SDS в восстанавливающих условиях проводили без IAM (объединив 7 мкл буфера для образцов HT Protein Express с 5 мкл разведенного образца). Способ был обновлен для включения IAM перед исследованием стабильности, описанным в Примере 12, для уменьшения наблюдаемой изменчивости из-за искусственных изменений чистоты, вызванных взаимодействием SDS с образцом.

Во втором исследовании стабильности IAM добавляли к восстанавливающему рабочему раствору, чтобы уменьшить изменчивость чистоты, связанную с присутствием свободных сульфгидрилов, вызванную добавлением SDS. Сульфгидрилы могут индуцировать образование новых соединений за счет скремблирования дисульфидных связей, наблюдаемых в виде новых пиков, что приводит к искусственному снижению чистоты образца. IAM представляет собой алкилирующий агент, который может блокировать сульфгидрилы и предотвращать скремблирование дисульфидных связей.

#### Результаты и обсуждения

Биофизическое тестирование:

Биофизическое тестирование проводили с помощью DSF и DLS для оценки

влияния идентичности буфера, pH раствора и вспомогательных веществ на стабильность IgG1-C-E430G. Оцененные составы показаны в таблице 5. Результаты, полученные из анализа DSF и DLS, показаны в таблице 8.

Таблица 8. Биофизическое исследование - результаты DSF и DLS

BS ID	DLS средн T <sub>onset</sub> °C	DSF средн T <sub>m1</sub> °C	DLS средн T <sub>onset2</sub> °C	DSF средн T <sub>m2</sub> °C	T <sub>agg</sub> при SLS 266 нм °C	T <sub>agg</sub> при SLS 473 нм °C	DLS средн Z-Ave. Dia (нм)	DLS Avg. PDI	DLS средн Pk 1 Mode Dia (нм)	DLS средн Pk 1 Полидисперсность (%)	Модалность DLS	DLS Pk 1 % Массы
F1	51,9	57,7	72	82,2	83,7	83,6	12,1	0,4	9,9	29,7	Мультимодальный	99,99
F2	52,1	57,5	72,2	82,2	78,5	79	12,6	0,1	10,6	20,3	Мультимодальный	99,92
F3	51,5	57,1	72,5	84,3	81	81,3	11,0	0,5	10,9	34,8	Мономодальный	100,00
F4	52,4	59,1	73,8	83,5	83,3	83,2	18,1	0,1	12,1	25,4	Мультимодальный	99,50
F5	55,2	60,5	74,3	90,3	84,7	84,1	11,9	1,2	13,1	35,6	Мультимодальный	99,99
F6	47,8	55,1	72,3	83	74,6	72,7	14,7	0,0	10,7	19,5	Мультимодальный	99,79
F7	48	54,4	71,4	83,8	77,9	78,5	15,0	0,1	10,7	15,4	Мультимодальный	99,80
F8	48,1	53,7	71,1	82,8	79,7	79,8	10,7	0,6	12,4	28,0	Мономодальный	100,00
F9	51,6	56,5	74,3	83,6	75,3	74,8	13,3	0,3	11,5	29,2	Мультимодальный	99,96
F10	51,7	57,2	73,4	84,5	69,7	66,3	23,6	0,3	13,5	28,7	Мультимодальный	99,85
F11	52,4	58,2	73,9	84,6	75,2	75,7	11,2	0,2	10,1	18,2	Мультимодальный	99,99
F12	52,1	57,3	73	83,5	80,2	80,4	10,6	0,1	10,7	11,5	Мономодальный	100,00
F13	51,9	56,8	72,7	84,7	81,7	81,8	10,6	0,6	11,0	19,2	Мономодальный	100,00
F14	54,6	59,4	74,2	85,9	75,2	78,5	19,4	0,0	12,8	29,8	Мультимодальный	99,77
F15	55,1	59,6	75,6	86,1	79,1	83,3	11,8	1,4	13,1	36,3	Мультимодальный	99,95
F16	56,8	61,7	78,1	88,1	75,3	75,2	11,4	0,1	9,9	21,6	Мультимодальный	100,00

T<sub>m</sub>: температура плавления; T<sub>onset</sub>: начало агрегации; T<sub>agg</sub>: температура агрегации; средн Z-Ave: Среднее значение Z-Ave; Dia: диаметр; PDI: индекс полидисперсности; средн Pk 1: Среднее для пика 1.

На основании данных, полученных из DSF и DLS, ацетатный буфер обеспечивает лучшую термостабильность по сравнению с гистидиновым, о чем свидетельствуют более высокие значения T<sub>onset</sub> и более высокие значения T<sub>agg</sub>. Однако степень агрегации была значительно выше в ацетатных составах, о чем свидетельствует повышенное количество SLS как при 266 нм, так и при 473 нм при повышенных температурах. Наблюдалась положительная корреляция с pH раствора, и как T<sub>onset</sub>, так и T<sub>agg</sub> указывали на большую термическую стабильность при более высоком pH. Однако также наблюдалась положительная корреляция между pH раствора и количеством SLS при 266 нм и 473 нм, что указывает на то, что растворы с более низким pH могут придавать большую

коллоидную стабильность IgG1-C-E430G в растворе. Составы с сахарозой, по-видимому, образовывали более крупные агрегаты IgG1-C-E430G из-за более высокого диаметра  $r_k$  1 (т.е. размера основного пика в анализе DLS) и значений полидисперсности, наблюдаемых с этим вспомогательным веществом.

Выбранные препараты подвергались дальнейшему скринингу после того, как они прошли скрининг на физический стресс с циклами замораживания-оттаивания и непрерывным физическим перемешиванием. Добавление поверхностно-активного вещества PS80 также подвергалось скринингу на предмет его влияния на стабильность IgG1-C-E430G.

Исследование физического стресса и влияния поверхностно-активных веществ:

Был проведен скрининг двенадцати препаратов для оценки влияния pH раствора, вспомогательных веществ и поверхностно-активного вещества на стабильность IgG1-C-E430G. Препараты, проверенные на физическую нагрузку и исследование поверхностно-активных веществ, показаны в таблице 6. Препараты с аргинином были исключены из-за биофизических результатов, полученных при анализе DSF. Результаты для каждого аналитического анализа представлены в таблицах ниже.

Таблица 9. Исследование физического стресса - результаты внешнего вида

Состав	Условие	Цвет	Прозрачность	Взвесь
20 mM ацетат, 150 mM NaCl, pH 5,5	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	очень незначительное количество частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	очень незначительное количество частиц
20 mM ацетат, 250 mM сахараза, pH 5,5	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	очень незначительное количество частиц
20 mM Гистидин, pH 6,0	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 mM Гистидин, 150 mM NaCl, pH 6,0	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 mM Гистидин, 250 mM Сорбитол, pH 6,0	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц

		желтый	жидкость	
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	очень незначительное количество частиц
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, pH 6,0	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц, за исключением одной нити <sup>1</sup>
20 мМ Гистидин, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц, за исключением одной нити <sup>1</sup>
	Перемешивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	прозрачная жидкость	без видимых частиц

<sup>1</sup> Возможно, пылинка

Таблица 10А. Исследование физического стресса - результаты DLS

Буфер	pH	Экспец-иент	PS80 (%)	Z-среднее диаметра для исходных образцов (нм)	Z-среднее диаметра для Замораживания-оттаивания (нм)	Дельта Замораживания-оттаивания (нм)	Перемешивание Z-среднее диаметра (нм)	Исходное средн %Pd	средн Замораживани-я-оттаивания %Pd	средн Перемешивания %Pd	Исходное средн Диаметр Пик2 (нм) (I)	Замораживани-е-оттаивание средн Диаметр Пика2 (нм) (I)	Перемешивание средн Диаметр Пика2 (нм) (I)
Аце-тат	5,5	NaCl	Нет	13,0	13,1	0,1	12,8	0,1	0,1	0,1	13,2	12,9	13,2
Аце-тат	5,5	Сахароза	Нет	11,2	11,1	-0,1	11,2	0,3	0,4	0,3	11,0	11,1	11,6
Гистидин	6,0	Нет	Нет	8,7	9,0	0,2	8,5	0,2	0,4	0,1	9,0	8,3	8,1
Гистидин	6,0	NaCl	Нет	13,5	14,1	0,6	13,3	0,1	0,4	0,1	13,6	13,6	13,6
Гистидин	6,0	Сорбитол	Нет	15,2	13,1	-2,1	13,4	1,4	1,0	0,8	9,7	9,2	9,4
Гистидин	6,0	Сахароза	Нет	10,7	11,0	0,3	11,0	0,4	0,3	0,3	11,3	11,0	10,7
Аце-тат	5,5	NaCl	0,04%	13,2	13,1	-0,1	13,1	0,2	0,1	0,1	13,2	12,9	12,9
Аце-тат	5,5	Сахароза	0,04%	11,3	10,8	-0,5	10,9	0,3	0,4	0,3	11,9	11,6	11,0
Гистидин	6,0	Нет	0,04%	8,6	8,5	-0,1	8,7	0,1	0,1	0,1	9,0	8,5	8,3
Гистидин	6,0	NaCl	0,04%	13,9	13,0	-0,9	13,1	0,2	0,1	0,2	13,2	13,2	13,2
Гистидин	6,0	Сорбитол	0,04%	10,6	10,6	0,1	10,0	0,1	0,1	0,3	9,7	9,4	9,7
Гистидин	6,0	Сахароза	0,04%	7,5	10,2	2,8	10,8	0,3	0,4	0,3	11,3	10,5	9,7

% Pd = процент полидисперсности

Таблица 10В. Исследование физического стресса - результаты DLS

Буфер	pH	Экспец-иент	PS80 (%)	Исходное средн Пик2 %Pd (I)	Замораживани-е-оттаивание средн Пик2 %Pd (I)	Перемешивание средн Пик2 %Pd (I)	Исходная модальность	Модальность после замораживания/оттаивания	Модальность после перемешивания
Ацетат	5,5	NaCl	Нет	20,5	17,7	16,5	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Ацетат	5,5	Сахароза	Нет	30,5	29,5	31,0	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	Нет	Нет	26,4	31,8	29,2	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	NaCl	Нет	18,9	23,8	16,8	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	Сорбитол	Нет	22,2	19,4	22,3	Мономодальный	Мультимодальный	Мультимодальный
Гистидин	6,0	Сахароза	Нет	30,7	26,1	21,3	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Ацетат	5,5	NaCl	0,04%	19,7	26,3	24,6	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Ацетат	5,5	Сахароза	0,04%	31,7	29,1	28,2	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	Нет	0,04%	23,8	23,0	28,5	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	NaCl	0,04%	27,2	20,5	16,5	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	Сорбитол	0,04%	25,9	29,0	20,6	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный
Гистидин	6,0	Сахароза	0,04%	28,7	25,5	30,2	Мономодальный	Мономодальный	Мономодальный

Таблица 11. Исследование физического стресса - результаты A<sub>280</sub>

Код состава	Образец	Конц. (мг/мл)
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, pH 5,5	Контроль	21,7
	Перемешивание	21,4
	Замораживание/оттаивание	21,8
20 мМ ацетат, 250 мМ сахараза, pH 5,5	Контроль	22,2
	Перемешивание	21,9
	Замораживание/оттаивание	21,7
20 мМ Гистидин, pH 6,0	Контроль	22,8
	Перемешивание	22,5
	Замораживание/оттаивание	22,5
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, pH 6,0	Контроль	21,6
	Перемешивание	22,2

	Замораживание/оттаивание	21,9
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, pH 6,0	Контроль	21,5
	Перемешивание	22,2
	Замораживание/оттаивание	21,6
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, pH 6,0	Контроль	21,9
	Перемешивание	21,7
	Замораживание/оттаивание	21,4
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	21,9
	Перемешивание	22,4
	Замораживание/оттаивание	22,6
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	22,3
	Перемешивание	22,8
	Замораживание/оттаивание	22,7
20 мМ Гистидин, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	22,7
	Перемешивание	22,7
	Замораживание/оттаивание	22,7
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	22,0
	Перемешивание	22,5
	Замораживание/оттаивание	22,5
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	22,2
	Перемешивание	22,0
	Замораживание/оттаивание	22,2
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, pH 6,0, 0,04% PS80	Контроль	22,5
	Перемешивание	22,8
	Замораживание/оттаивание	22,2

Таблица 12. Исследование физического стресса - результаты мутности

Состав	Образец	A <sub>550</sub> (AU)
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, pH 5,5	Контроль	0,04244
	Перемешивание	0,04658
	Замораживание/оттаивание	0,04404
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, pH 5,5	Контроль	0,02345
	Перемешивание	0,03125
	Замораживание/оттаивание	0,04969
20 мМ Гистидин, pH 6,0	Контроль	0,04515
	Перемешивание	0,02795
	Замораживание/оттаивание	0,01916
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, pH 6,0	Контроль	0,04425
	Перемешивание	0,03002
	Замораживание/оттаивание	0,03813
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, pH 6,0	Контроль	0,03038
	Перемешивание	0,01559
	Замораживание/оттаивание	0,03248
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, pH 6,0	Контроль	0,03673
	Перемешивание	0,03689
	Замораживание/оттаивание	0,08891
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	0,03743
	Перемешивание	0,02207
	Замораживание/оттаивание	0,02036
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, pH 5,5, 0,04% PS80	Контроль	0,02019
	Перемешивание	0,02036
	Замораживание/оттаивание	0,04208

20 мМ Гистидин, рН 6,0, 0,04% PS80	Контроль	0,01594
	Перемешивание	0,01374
	Замораживание/оттаивание	0,01612
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, рН 6,0, 0,04% PS80	Контроль	0,02464
	Перемешивание	0,02275
	Замораживание/оттаивание	0,02205
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, рН 6,0, 0,04% PS80	Контроль	0,02088
	Перемешивание	0,02585
	Замораживание/оттаивание	0,02225
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, рН 6,0, 0,04% PS80	Контроль	0,13415 <sup>1</sup>
	Перемешивание	0,03337
	Замораживание/оттаивание	0,03637

<sup>1</sup> Вероятно, выпадающее значение, так как два образца, подвергнутых нагрузке, в этом препарате имели более низкие значения  $A_{550}$ .

Таблица 13. Исследование физического стресса - результаты SEC

ID	PS80 (%)	Исходная чистота SEC (%)	Чистота SEC после замораживания/оттаивания (%)	SEC после перемешивания (%)	Исходное SEC HMW (%)	SEC HMW после замораживания/оттаивания (%)	SEC HMW после перемешивания (%)	Исходное SEC LMW (%)	SEC LMW после замораживания/оттаивания (%)	SEC LMW после перемешивания (%)
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, рН 5,5	Нет	99,0	98,7	99,0	0,7	1,1	0,8	0,3	0,2	0,2
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, рН 5,5	Нет	99,2	99,4	99,3	0,6	0,4	0,5	0,2	0,1	0,2
20 мМ Гистидин, рН 6,0	Нет	99,2	99,5	99,3	0,6	0,4	0,5	0,2	0,1	0,2
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, рН 6,0	Нет	99,1	99,3	99,3	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, рН 6,0	Нет	99,2	99,5	99,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, рН 6,0	Нет	99,2	99,5	99,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1
20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl, рН 5,5, 0,04% PS80	0,04%	99,0	99,1	99,1	0,8	0,7	0,7	0,3	0,2	0,3
20 мМ ацетат, 250 мМ сахароза, рН 5,5, 0,04% PS80	0,04%	99,2	99,5	99,4	0,5	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1
20 мМ Гистидин, рН 6,0, 0,04% PS80	0,04%	99,3	99,4	99,3	0,5	0,4	0,5	0,2	0,2	0,3
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, рН 6,0, 0,04% PS80	0,04%	99,3	99,2	99,3	0,5	0,6	0,5	0,2	0,2	0,2
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сорбитол, рН 6,0, 0,04% PS80	0,04%	99,3	99,6	99,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1
20 мМ Гистидин, 250 мМ Сахароза, рН 6,0, 0,04% PS80	0,04%	99,2	99,5	98,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,1	1,2

С точки зрения идентичности буфера, только препарат, содержащий 20 мМ ацетата, 150 мМ NaCl, при рН 5,5 показал видимые частицы после воздействия 48 часов непрерывного перемешивания. Препараты, содержащие 20 мМ ацетата, 150 мМ NaCl при рН 5,5 и 20 мМ ацетата, 250 мМ сахарозы при рН 5,5 и 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола при рН 6,0 были единственными препаратами, которые, как наблюдалось, образовывали частицы после пяти циклов замораживания-оттаивания. Однако при сравнении этих препаратов с их аналогами, содержащими 0,04% (масс./об.) PS80, частиц не наблюдается, что указывает на то, что включение PS80 в состав IgG1-C-E430G может

способствовать защите от образования частиц.

Что касается эксцепиентов, данные SLS (таблица 8) продемонстрировали, что препараты с заряженными эксцепиентами (NaCl, аргинин) имели значительно более высокие значения SLS как при 266, так и 473 нм при повышенных температурах по сравнению со значениями SLS сахарных эксцепиентов, что указывает на то, что сахара обеспечивают более высокую коллоидную стабильность IgG1-C-E430G.

Препарат, содержащий 20 мМ ацетат, 150 мМ NaCl при pH 5,5, был единственным препаратом, в котором наблюдалось снижение чистоты после физического стресса после пяти циклов замораживания-оттаивания. Однако включение PS80 в состав предотвращает рост агрегатов после замораживания-оттаивания, поскольку чистота остается неизменной даже после замораживания-оттаивания.

Наблюдалось изменение  $A_{280}$  IgG1-C-E430G после циклов замораживания-оттаивания в составах с сахарозой.

На основании этих скомпилированных результатов в качестве оптимального препарата IgG1-C-E430G был выбран препарат, содержащий 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола, 0,04% (масс./об.) PS80, pH 6,0.

#### Исследование стабильности

Стабильность идентифицированного состава IgG1-C-E430G, содержащего 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола, 0,04% PS80, pH 6,0 (таблица 7), затем оценивали при 20 мг/мл в течение 8 недель в условиях хранения  $5\pm 3^\circ\text{C}$ ,  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{RH}$  и  $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%\text{RH}$ . Исходные образцы тестировали по внешнему виду, pH,  $A_{280}$ , SE-HPLC, iCIEF, на микрочипе CE-SDS (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях). Дополнительные образцы были подготовлены в начальный момент времени и подвергнуты пяти циклам замораживания-оттаивания, а также физическому перемешиванию (400 об/мин в течение 48 часов) для подтверждения результатов исследования физического стресса. Результаты отдельных анализов представлены в таблицах ниже.

Таблица 14. Результаты исследования стабильности LoC-NR

Временная точка	Условие	% основного пика	% веществ, связанных с передней стороной/Примеси <sup>1</sup>	% веществ, связанных с задней стороной/Примеси	% общих связанных веществ/Примеси
Исходная	N/A	95,0	5,0	Не обнаружено (ND)	5,0
	Замораживание/оттаивание	95,8	4,2	ND	4,2
	Перемешивание	94,8	5,2	ND	5,2
2 недели	2-8°C	91,4	8,6	ND	8,6



	25°C/60%RH	91,1	8,9	ND	8,9
	40°C/75%RH	90,2	9,8	ND	9,8
4 недели	2-8°C	91,2	8,8	ND	8,8
	25°C/60%RH	92,1	7,9	ND	7,9
	40°C/75%RH	91,0	9,0	ND	9,0
8 недели	2-8°C	88,8	11,2	ND	11,2
	25°C/60%RH	91,2	8,8	ND	8,8
	40°C/75%RH	89,7	10,3	ND	10,3

<sup>1</sup> Вариабельность примесей (фрагментов), связанных с передней стороной, вероятно, обусловлена неконтролируемым скремблированием дисульфидных связей, катализируемым свободными сульфгидрильными группами, из-за отсутствия алкилирующего агента при приготовлении образцов.

Таблица 15. Результаты исследования стабильности LoC-R

Временная точка	Условие	% легкой цепи	% тяжелой цепи	% общих связанных веществ/ Примеси	% чистоты
Исходная	N/A	34,5	64,2	1,3	98,7
	Замораживание/оттаивание	34,5	64,4	1,2	98,8
	Перемешивание	34,6	64,1	1,4	98,6
2 недели	2-8°C	33,9	63,9	2,1	97,9
	25°C/60%RH	34,0	63,8	2,2	97,8
	40°C/75%RH	34,5	62,9	2,6	97,4
4 недели	2-8°C	34,4	63,1	2,5	97,5
	25°C/60%RH	34,4	63,2	2,4	97,6
	40°C/75%RH	34,9	61,9	3,2	96,8
8 недель	2-8°C	34,6	62,0	3,4	96,6
	25°C/60%RH	34,8	62,4	2,8	97,2
	40°C/75%RH	35,5	61,0	3,5	96,5

Таблица 16. Результаты исследования стабильности icIEF

Временная точка	Условие	% кислотных вариантов	% основного пика	% основных вариантов	pI основного пика
Исходная	N/A	49,53	50,47	ND	8,81
	Замораживание/оттаивание	49,01	51,00	ND	8,80
	Перемешивание	50,58	49,42	ND	8,80
2 недели	2-8°C	47,32	52,68	ND	8,81
	25°C/60%RH	48,49	51,51	ND	8,81
	40°C/75%RH	57,45	42,55	ND	8,81
4 недели	2-8°C	50,55	49,45	ND	8,80
	25°C/60%RH	50,81	49,19	ND	8,80
	40°C/75%RH	65,58	34,42	ND	8,80
8 недель	2-8°C	51,47	48,53	ND	8,82
	25°C/60%RH	55,26	44,74	ND	8,82
	40°C/75%RH	72,91	27,09	ND	8,82

На основании данных, полученных в результате исследования стабильности, не было обнаружено никакого влияния на внешний вид или содержание частиц в растворах, независимо от условий хранения. По-видимому, не было никакого влияния на pH раствора или  $A_{280}$ , независимо от условий хранения в течение всего периода исследования, за исключением  $A_{280}$  при  $40\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\% \text{RH}$ , которое со временем увеличивалось. Это

увеличение  $A_{280}$ , вероятно, можно отнести к испарению при более высокой температуре хранения.

Результаты SE-HPLC показали, что не было никакого влияния на чистоту IgG1-C-E430G после физического стресса циклов замораживания-оттаивания или 48 часов или непрерывного перемешивания. Каждое условие демонстрировало сходные тенденции в отношении чистоты мономера в ходе исследования со снижением чистоты в каждый момент времени, однако влияние на чистоту было более значительным в условиях ускоренного хранения при  $40 \pm 2^\circ\text{C}/70 \pm 5\% \text{ RH}$ . В условиях температурного стресса количество как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных видов IgG1-C-E430G со временем увеличивалось. Для условий  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  и  $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$  через 8 недель наблюдалось только увеличение % LMW.

Никаких существенных изменений в чистоте IgG1-C-E430G по анализу LoC-NR не наблюдалось. В восстанавливающих условиях чистота IgG1-C-E430G снижалась, и наблюдалась повышенная фрагментация для всех условий вплоть до 8 недель, хотя изменения были более выраженными в ускоренных условиях хранения.

Результаты icIEF показали, что не было изменений в гетерогенности заряда IgG1-C-E430G в номинальных условиях ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ), однако были изменения в обоих ускоренных условиях хранения ( $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$  и  $40 \pm 2^\circ\text{C}/70 \pm 5\% \text{ RH}$ ). Увеличение % кислотных вариантов наблюдалось в каждый последующий момент времени, вероятно, в результате дезамидирования белка в условиях ускоренного хранения. Изменений pI основного пика не было независимо от условий хранения на протяжении всего исследования.

#### Выводы

На основании результатов, полученных в результате биофизического исследования, исследования физического стресса и исследования с поверхностно-активным веществом, препарат, содержащий 20 мМ гистидин, 250 мМ сорбитол, 0,04% PS80, при pH 6,0 (таблица 7), был определен в качестве оптимального препарата IgG1-C-E430G при оценке стабильности продукта при номинальных и ускоренных условиях хранения.

Первоначальное биофизическое исследование оценивало влияние типа буфера, вспомогательных веществ и pH на термическую и конформационную стабильность IgG1-C-E430G. Основываясь на результатах, полученных в результате DSF и DLS, оказалось, что ацетат обеспечивает лучшую термостабильность по сравнению с гистидином, с более высокими наблюдаемыми значениями  $T_{\text{onset}}$  и  $T_{\text{agg}}$ , однако степень агрегации была значительно выше в препаратах с ацетатом, что наблюдалось по результатам SLS при 266 и 473 нм при повышенных температурах. Препараты с ацетатом обычно имеют меньший диаметр частиц  $z\text{-avg}$ , за исключением препарата с 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола

при рН 5,5. Однако оказалось, что ацетатные составы также имеют более высокий % средней полидисперсности  $pk\ 1$  по сравнению с гистидином, что указывает на более крупные агрегаты, присутствующие в ацетатных составах.

Что касается рН раствора, наблюдалась положительная корреляция между препаратами с гистидином и значениями  $T_{agg}$ , что указывает на то, что более высокий рН раствора может повышать температуру начала агрегации белка. Однако подсчет SLS показал, что степень агрегации выше в растворах с высоким рН, что указывает на то, что препараты с более низким рН обладают большей коллоидной стабильностью. Результаты DLS показали, что полидисперсность  $pk\ 1$  была самой высокой в составе с высоким рН (6,5), что указывает на то, что растворы с более высоким рН потенциально могут иметь более высокую популяцию олигомеров, таких как димеры и тримеры IgG1-C-E430G.

Что касается эксцipientов, данные SLS продемонстрировали, что составы с заряженными эксцipientами (NaCl, аргинин) имели значительно более высокие значения SLS как при 266, так и 473 нм при повышенных температурах по сравнению со значениями SLS для сахарных эксцipientов, что указывает на то, что сахара обеспечивают более высокую коллоидную стабильность IgG1-C-E430G. Составы с сахарозой в целом имели наиболее высокое значение диаметра  $pk\ 1$  и значение полидисперсности  $pk\ 1$ , что указывает на то, что эти составы содержали большие популяции малых олигомеров. Хотя  $z$ -среднее диаметра частиц было больше в некоторых составах из-за наличия вторичной популяции (мультимодальной), общий массовый % пика 1 в этих образцах очень высок (>99%), что указывает на то, что общий вклад вторичного диаметра минимальный.

Шесть лучших препаратов, отобранных в результате биофизического исследования, были дополнительно оценены в присутствии факторов физического стресса (48 часов перемешивания при 400 об/мин и пять циклов замораживания-оттаивания). Эти препараты также оценивали с добавлением PS80, чтобы определить, оказывает ли поверхностно-активное вещество какую-либо пользу составу IgG1-C-E430G. Проверка внешнего вида не показала различий в цвете или прозрачности после воздействия стрессовых условий. Однако образование частиц наблюдали в препарате с 20 мМ ацетата, 150 мМ NaCl при рН 5,5 после перемешивания в течение 48 часов. Препараты, содержащие 20 мМ ацетата, 150 мМ NaCl при рН 5,5, 20 мМ ацетата, 250 мМ сахарозы при рН 5,5 и 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола при рН 6,0 были единственными препаратами, в которых наблюдались частицы после пяти циклов замораживания-оттаивания. Включение PS80 в препарат, по-видимому, помогает предотвратить образование твердых частиц после замораживания-оттаивания или физического

воздействия при перемешивании для всех образцов. По результатам DLS было замечено, что препараты с NaCl демонстрируют более высокий z-среднее диаметра частиц. По-видимому, не было различий в z-среднем диаметре частиц между препаратами с PS80 и без него, за исключением препаратов с 20 мМ гистидина и сахара (250 мМ сорбитола и 250 мМ сахарозы), где наблюдалось значительное уменьшение z-среднего диаметра частиц с 0,04% (масс./об.) PS80, включенного в препарат. Это указывает на то, что PS80 потенциально может помочь предотвратить агрегацию IgG1-C-E430G в составах с гистидином и сахаром. Результаты SE-HPLC показали, что ацетат с NaCl показали снижение чистоты после циклов замораживания-оттаивания, что было связано с ростом % высокомолекулярных частиц, однако это падение чистоты было смягчено добавлением в раствор PS80 без снижения чистоты, наблюдаемой после воздействия факторов физического стресса. На основании полученных данных DLS, внешнего вида и SE-HPLC было показано, что препарат с 20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола, 0,04% PS80 при pH 6,0 является оптимальным препаратом для достижения стабильности.

Наконец, было проведено исследование стабильности для оценки оптимального состава IgG1-C-E430G (20 мМ гистидина, 250 мМ сорбитола, 0,04% PS80, pH 6,0) при 20 мг/мл. Образцы инкубировали в номинальных условиях ( $5\pm 3^\circ\text{C}$ ) и в двух условиях, ускоряющих разрушение препарата ( $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{RH}$  и  $40\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{RH}$ ) в течение восьми недель. После инкубации образцы тестировали по внешнему виду, pH, A<sub>280</sub>, SE-HPLC, LoC и icIEF. Циклы замораживания-оттаивания и физическое перемешивание оценивали в начальный момент времени для этого исследования стабильности.

Внешний вид, pH и тесты A<sub>280</sub> не показали различий в условиях хранения, и до 8 недель не наблюдалось никаких видимых частиц.

Результаты SE-HPLC показали снижение чистоты мономера для каждой временной точки в каждом состоянии, хотя влияние было наиболее значительным в ускоренных условиях. Ускоренные условия ( $40\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{RH}$ ) также были единственным образцом, в котором наблюдалось увеличение % частиц с высокой молекулярной массой, в то время как в двух других условиях наблюдалось увеличение только % частиц с низкой молекулярной массой.

По результатам LoC-NR в каждом образце наблюдалось начальное падение чистоты к 2-недельному моменту времени, однако примеси могут достичь равновесия и не увеличиваться дальше. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимо проанализировать дополнительные временные точки.

Результаты icIEF показали, что % основного пика, % кислотных вариантов и % основных вариантов одинаковы во всем исследовании для номинальных условий ( $5\pm 3^\circ\text{C}$ ).

Однако в ускоренных условиях ( $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{RH}$  and  $40\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{RH}$ ) деградация % основного пика привела к увеличению % кислотных вариантов, что указывает на потенциальное дезаминирование IgG1-C-E430G при более высоких температурах.

*Пример 12. Препараты антитела – второе исследование стабильности*

Было проведено второе исследование стабильности препарата с 20 мг/мл IgG1-C-E430G (в 20 mM гистидина, 250 mM сорбитола, pH 6,0, 0,04% PS80).

Методы

За исключением случаев, предусмотренных ниже, используемые методы описаны в Примере 11.

Визуализация микропотоков (MFI):

В этом способе используется микроскоп для визуализации микропотоков (MFI) ProteinSimple для сбора изображений и определения характеристик частиц, невидимых невооружённым глазом. Анализ образцов проводили путем переноса 1 мл каждого образца в лунку на 96-луночном планшете Eppendorf Deepwell. Инструментальный метод создан с использованием системного программного обеспечения MFI View (MVSS). Прибор собирает изображения для всех частиц с эквивалентным диаметром в круглом поперечном сечении (ECD)  $\geq 1$  и  $\leq 100$  микрон.

После анализа образцов программное обеспечение MVSS используется для применения морфологических фильтров к собранным изображениям и группировки частиц в популяции на основе общих характеристик. Изображения отфильтровывали по ECD в следующие группы: ECD  $\geq 2$  микрон, ECD  $\geq 5$  микрон, ECD  $\geq 10$  микрон и  $\geq 25$  микрон. Морфологический фильтр отношения сторон применяется с отсечкой  $\geq 0,85$  к популяции  $\geq 5$  микрон, которая идентифицирует изображения, содержащие круглые и некруглые частицы. Некруглые частицы (AR  $< 0,85$ ), как правило, имеют белковое происхождение, тогда как круглые частицы (AR  $\geq 0,85$ ), как правило, состоят из пузырьков воздуха и силиконового масла.

Затем изображения, содержащие круглые частицы, можно охарактеризовать как пузырьки воздуха или частицы силикона на основе минимальной интенсивности, которую программное обеспечение MVSS определяет как интенсивность самого светлого пикселя внутри частицы. Фильтры используются для группировки круглых частиц с интенсивностью  $\text{min} > 75$  в виде пузырьков воздуха и частиц с интенсивностью  $\text{min} \geq 75$  и  $\leq 300$  в виде силиконовых частиц. Силиконовая фракция и фракция с круглым поперечным сечением затем могут быть определены путем деления количества частиц, определенных как силиконовые или с круглым поперечным сечением, на общее количество частиц с таким же ECD.

Результаты для этого способа представлены в виде количества частиц на мл для желаемой группы характеристики, определяемой морфологическими признаками. Результаты MFI можно использовать для оценки стабильности сформированного антитела путем наблюдения за изменениями количества частиц в ходе исследования стабильности. MFI используется только для косвенной характеристики частицы, а не как прямое измерение композиции частицы.

### Результаты

Результаты второго исследования стабильности показаны в таблицах ниже.

Таблица 17. Внешний вид

Временная точка	Условие	Цвет	Прозрачность	Взвесь
Исходная	Контроль	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
	Перемешивание	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
	Контроль перемешивания	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
	Замораживание/оттаивание	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
2 недель	2-8°C	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
	25°C/60%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
	40°C/75%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Без видимых частиц
4 недель	2-8°C	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
	25°C/60%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
	40°C/75%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
8 недель	2-8°C	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
	25°C/60%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
	40°C/75%RH	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
12 недель	2-8°C	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц
	25°C/60%RH	Еще менее желтый	Прозрачная жидкость	Некоторое количество видимых частиц
	40°C/75%RH	Слабо желтый	Прозрачная жидкость	Очень незначительное количество видимых частиц

Таблица 18. pH

Временная точка	Условие	pH
Исходная	N/A	6,0
	Замораживание/оттаивание	6,0
	Перемешивание	6,0
	Контроль перемешивания	6,0
2 недели	2-8°C	6,0

	25°C/60%RH	5,9
	40°C/75%RH	5,9
4 недели	2-8°C	5,9
	25°C/60%RH	5,9
	40°C/75%RH	5,9
8 недель	2-8°C	6,0
	25°C/60%RH	6,0
	40°C/75%RH	6,0
12 недель	2-8°C	5,9
	25°C/60%RH	5,9
	40°C/75%RH	5,9

Таблица 19. Поглощение при 280 нм (A<sub>280</sub>)

Временная точка	Условие	Концентрация (мг/мл)
Исходная	N/A	20,6
	Замораживание-оттаивание	20,9
	Перемешивание	21,0
	Контроль перемешивания	21,1
2 недели	2-8°C	21,2
	25°C/60%RH	21,2
	40°C/75%RH	20,7
4 недели	2-8°C	20,9
	25°C/60%RH	21,4
	40°C/75%RH	21,4
8 недель	2-8°C	21,4
	25°C/60%RH	20,4
	40°C/75%RH	21,4
12 недель	2-8°C	22,2
	25°C/60%RH	21,9
	40°C/75%RH	21,5

Таблица 20. Эксклюзионная хроматография по размеру (SEC)

Временная точка	Условие	% HMW	% мономера	% LMW	Общие примеси	Общая площадь (mAU*с)
Исходная	N/A	1,3	98,6	0,1	1,4	4286
	Замораживание-оттаивание	1,3	98,6	0,2	1,4	4290
	Перемешивание	1,3	98,5	0,2	1,5	4331
	Контроль перемешивания	1,3	98,5	0,2	1,5	4228
2 недели	2-8°C	1,4	98,5	0,1	1,5	4093
	25°C/60%RH	1,5	98,3	0,2	1,7	4253
	40°C/75%RH	2,4	97,0	0,5	3,0	4115
4 недели	2-8°C	1,4	98,5	0,1	1,5	4307
	25°C/60%RH	1,6	98,2	0,2	1,8	4336
	40°C/75%RH	2,5	96,5	1,0	3,5	4112
8 недель	2-8°C	1,7	98,3	ND	1,7	4406
	25°C/60%RH	1,8	97,8	0,3	2,2	4196
	40°C/75%RH	3,8	94,1	2,1	5,9	4064
12 недель	2-8°C	1,5	98,4	0,1	1,6	4204
	25°C/60%RH	2,0	97,6	0,5	2,4	4170
	40°C/75%RH	3,9	92,7	3,4	7,3	3890

Таблица 21. LoC-NR

Временная точка	Условие	% основного пика	% веществ, связанных с передней стороной/ Примеси	% веществ, связанных с задней стороной/ Примеси	% общих связанных веществ/ Примеси
Исходная	N/A	92,4	7,6	ND	7,6
	Замораживание/оттаивание	92,2	7,8	ND	7,8
	Перемешивание	92,2	7,8	ND	7,8
	Контроль перемешивания	92,2	7,8	0,1	7,8
2 недели	2-8°C	90,8	9,0	0,2	9,2
	25°C/60%RH	90,1	9,6	0,2	9,9
	40°C/75%RH	88,5	11,2	0,3	11,5
4 недели	2-8°C	89,9	9,9	0,2	10,1
	25°C/60%RH	89,1	10,8	0,2	10,9
	40°C/75%RH	86,6	13,2	0,2	13,4
8 недель	2-8°C	89,7	10,1	0,2	10,3
	25°C/60%RH	89,1	10,9	ND	10,9
	40°C/75%RH	82,3	17,5	0,2	17,7
12 недель	2-8°C	94,7	5,3	ND	5,3
	25°C/60%RH	94,1	5,9	ND	5,9
	40°C/75%RH	87,7	12,3	ND	12,3

Таблица 22. LoC-R

Временная точка	Условие	% легкой цепи	NGHC %	% тяжелой цепи	% общих связанных веществ/ Примеси	% чистоты
Исходная	N/A	34,7	0,0	64,6	0,7	99,3
	Замораживание-оттаивание	34,7	0,0	64,6	0,7	99,3
	Перемешивание	34,6	0,1	64,6	0,8	99,2
	Контроль перемешивания	34,5	0,1	64,8	0,7	99,3
2 недели	2-8°C	33,9	0,0	65,2	0,9	99,1
	25°C/60%RH	34,2	0,0	64,7	1,1	98,9
	40°C/75%RH	34,6	0,1	63,8	1,6	98,4
4 недели	2-8°C	33,6	0,1	66,0	0,5	99,5
	25°C/60%RH	34,0	0,1	65,4	0,6	99,4
	40°C/75%RH	34,5	0,1	64,2	1,2	98,8
8 недель	2-8°C	33,8	0,0	64,9	1,3	98,7
	25°C/60%RH	33,7	0,1	64,3	2,0	98,0
	40°C/75%RH	34,8	0,8	60,2	5,0	95,0
12 недель	2-8°C	33,6	0,3	65,3	1,0	99,0
	25°C/60%RH	33,8	0,3	64,4	1,8	98,2
	40°C/75%RH	34,1	0,9	58,4	7,3	92,6

Таблица 23. Краткие сведения о MFI

Временная точка	Условие	Имп./мл						Фракция с круглым поперечным сечением, $\geq 5$ мкм
		$\geq 2$ мкм	$\geq 5$ мкм	$\geq 10$ мкм	$\geq 25$ мкм	$\geq 5$ мкм, AR $\geq 0,85$	$\geq 5$ мкм, AR $\leq 0,85$	
Исходная	N/A	7133	860	67	6	491	369	0,57
	Замораживание-оттаивание	14629	2071	287	31	613	1458	0,30
	Перемешивание	5667	514	71	8	155	359	0,30
	Контроль перемешивания	10503	1292	166	21	558	734	0,43
2 недели	2-8°C	1685	243	14	2	171	73	0,65
	25°C/60%RH	4762	1102	274	18	112	990	0,06



	40°C/75%RH	3998	695	28	2	93	602	0,10
4 недели	2-8°C	19602	2262	335	27	489	1772	0,22
	25°C/60%RH	10461	1625	220	4	141	1483	0,09
	40°C/75%RH	9226	1149	130	13	117	1032	0,10
8 недель	2-8°C	3458	619	113	17	218	401	0,35
	25°C/60%RH	6879	1276	161	6	166	1110	0,13
	40°C/75%RH	8652	2912	455	8	206	2706	0,07
12 недель	2-8°C	2051	166	21	4	88	78	0,53
	25°C/60%RH	13053	2504	552	50	147	2357	0,06
	40°C/75%RH	19035	4257	277	29	250	4007	0,06

Таблица 24. icIEF

Временная точка	Условие	% кислотных вариантов	% основного пика	% основных вариантов	pI
Исходная	N/A	49,4	45,7	4,9	8,8
	Замораживание-оттаивание	50,1	45,2	4,7	8,8
	Перемешивание	50,1	45,2	4,7	8,8
	Контроль перемешивания	50,1	45,3	4,6	8,8
2 недели	2-8°C	50,4	44,3	5,3	8,8
	25°C/60%RH	56,5	39,2	4,3	8,8
	40°C/75%RH	63,0	33,1	4,0	8,8
4 недели	2-8°C	52,0	43,3	4,7	8,8
	25°C/60%RH	59,0	37,2	3,8	8,8
	40°C/75%RH	69,2	28,1	2,7	8,9
8 недель	2-8°C	54,0	40,9	5,1	8,8
	25°C/60%RH	65,2	31,7	3,1	8,8
	40°C/75%RH	78,9	19,0	2,1	8,8
12 недель	2-8°C	54,1	41,2	4,6	8,8
	25°C/60%RH	64,9	31,5	3,6	8,8
	40°C/75%RH	84,3	13,8	1,8	8,8

*Пример 13. Определение аффинности связывания с использованием биослойной интерферометрии*

Аффинность связывания с мишенью антител IgG1-C-E430G и IgG1-B, специфических к CD38 человека, определяли с помощью биослойной интерферометрии без метки (BLI) на приборе Octet HTX (ForteBio). Эксперименты проводились при встряхивании 1000 об/мин и температуре 30°C.

Биосенсоры, основанные на принципе захвата антителами к Fc-фрагменту IgG человека (АНС) (ForteBio, кат. № 18-5060) предварительно кондиционировали воздействием 10 мМ глицинового буфера с pH 1,7 (Riedel-de Haën, кат. № 15227) в течение 5 с с последующей нейтрализацией в разбавителе образцов (ForteBio, кат. № 18-1104) в течение 5 с; обе стадии повторяли 5 раз. Затем датчики АНС загружали антителом (1 мкг/мл в разбавителе образца) на 600 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образца (100 с) определяли ассоциацию (200 с) и диссоциацию (1000 с) рекомбинантного His-CD38 (Genmab) с использованием диапазона концентраций 0,78–50 нМ (0,02–1,53 мкг/мл.) с 2-кратным разбавлением в разбавителе образца. Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу His-CD38, основанную на

аминокислотной последовательности (30,5 кДа). Для каждого антитела использовали референсный датчик, который инкубировали с разбавителем образца вместо антигена.

Данные были получены с использованием программного обеспечения для сбора данных v9.0.0.49d (ForteBio) и проанализированы с помощью программного обеспечения для анализа данных v9.0.0.14 (ForteBio). Данные измерений были скорректированы на антитело путем вычитания референсного датчика. Ось Y сопоставляли с последними 10 с исходного уровня, и применяли выравнивание межстадийной коррекции к диссоциации, а также фильтрацию Савицкого-Голая. Данные измерений с откликом <0,04 нм были исключены из анализа. Данные были аппроксимированы с моделью 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации и диссоциации, установленного на 200 с и 1000 с, соответственно.

«KD» (M) относится к константе равновесия диссоциации взаимодействия антитело-антиген и получается путем деления  $k_d$  на  $k_a$ . «Kd» (сек-1) относится к константе скорости диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Константу иногда также называют значением  $k_{off}$  или скоростью диссоциации. «Ka» (M-1 x sec-1) относится к константе скорости ассоциации взаимодействия антитело-антиген. Константу иногда также называют значением  $k_{on}$  или скоростью ассоциации.

В таблице 25 показаны результаты трех независимых экспериментов. Средняя аффинность (равновесная константа диссоциации, KD) для IgG1-C-E430G к His-CD38 составляла  $1,1 \pm 0,17$  нМ. Аффинность IgG1-B к His-CD38 составляла  $3,9 \pm 0,48$  нМ.

Таблица 25. Аффинность связывания антител CD38 с His-CD38

Антитело	Эксперимент	$K_D$ (M)	скорость ассоциации $k_a$ (1/Mc)	скорость диссоциации $k_d$ (1/c)
IgG1-C-E430G	1	1,0E-09	3,8E+05	4,0E-04
	2	9,5E-10	4,3E+05	4,1E-04
	3	1,3E-09	4,1E+05	5,2E-04
	<b>Среднее</b>	<b>1,1E-09</b>	<b>4,1E+05</b>	<b>4,4E-04</b>
	<b>STDEV</b>	<b>1,7E-10</b>	<b>2,4E+04</b>	<b>6,5E-05</b>
IgG1-B	1	4,2E-09	2,3E+05	9,5E-04
	2	3,4E-09	2,9E+05	9,8E-04
	3	4,2E-09	2,5E+05	1,1E-03
	<b>Среднее</b>	<b>3,9E-09</b>	<b>2,6E+05</b>	<b>9,9E-04</b>
	<b>STDEV</b>	<b>4,8E-10</b>	<b>3,3E+04</b>	<b>5,4E-05</b>

*Пример 14. Препараты антител – дополнительные исследования стабильности*

Дальнейшие исследования стабильности проводили на различных партиях А и В, содержащих 20 мг/мл IgG1-C-E430G, приготовленных в 20 mM гистидина, 250 mM сорбитола, 0,04% PS80, pH 6,0. Результаты перечислены в таблицах ниже и включают различные температуры хранения до 6 месяцев. Оценивались следующие параметры: внешний вид, цвет, опалесценция, субвидимые частицы, CE-SDS (красный) (R CE-SDS),

CE-SDS (не красный) (NR CE\_SDS), icIEF, SE-HPLC, ELISA, активность, A280 и pH, которые оценивали с использованием способов, описанных выше в примерах 11 и 12 и дополнительно описанных ниже. Приведенные ниже результаты подтверждают, что IgG1-C-E430G считается стабильным в составе и пригодным для медицинского применения.

Цвет и опалесценцию оценивали путем визуального осмотра в соответствии со стандартными способами, описанными в фармакопеях (Европейская фармакопея (Ph.Eur.) и Японская фармакопея (JP)). Цвет оценивали по цветовым стандартам, таким как «желтый» (Y), «коричневый» (B) или «коричнево-желтый» (BY) с шагом от 1 до 7 (1 — наиболее концентрированный раствор). Опалесценцию оценивали по сравнению с серией эталонных суспензий (RSI, RSII, RSIII и RSIV; последний раствор был наиболее опалесцирующим).

Невидимые частицы оценивали путем анализа затемнения света, вызванного свободно плавающими невидимыми частицами, в соответствии со стандартизированным способом, описанным в фармакопеях (Фармакопея США (USP), Европейская фармакопея (Ph.Eur.) и Японская фармакопея (JP)). Количество невидимых частиц, измеренное после объединения нескольких флаконов. Результат рассчитывается и представляется в виде частиц на флакон.

Активность определяли по комплементзависимой цитотоксичности (CDC), оцениваемой с использованием системы считывания CellTiter-Glo. Этот способ основан на катализе люциферина в светоизлучающий оксилуциферин в присутствии АТФ, что является показателем жизнеспособности клеток.

Вкратце, клетки-мишени Daudi размораживали и высевали по 105 клеток/лунку в белые непрозрачные 96-луночные культуральные планшеты в среде для анализа и выдерживали при комнатной температуре (КТ) в течение 60 минут. Серийные разведения НехаBody-CD38 готовили в среде для анализа в отдельных планшетах для разведения, добавляли к клеткам и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве источника эффекторных белков комплемента добавляли объединенную нормальную человеческую сыворотку в конечной концентрации 25% на лунку и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем планшеты заворачивали в прозрачную фольгу и инкубировали в течение 2,5 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После уравнивания при комнатной температуре в течение 30 минут добавляли реагент CellTiter-Glo. Планшеты встряхивали в течение 30 с при 400 об/мин, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и измеряли люминесценцию с помощью мультипланшетного ридера.

Связывание CD38 определяли с помощью ELISA следующим образом. Связывание

с антигеном-мишенью оценивали с использованием ELISA для связывания лиганда. Антиген-мишень (HIS-CD38) разводили в покрытых PBS планшетах Nunc Maxisorp ELISA, и инкубировали в течение 16-20 часов при 4°C. Планшеты для анализа промывали три раза с помощью промывочных устройств для ELISA с PBS-Tween-20 (0,05%) между каждой стадией. Планшеты для анализа блокировали PBS-T и затем инкубировали в течение 60 минут на шейкере с регулируемой температурой при 25°C и 300 об/мин. Серийные разведения образцов, приготовленных в PBS-T, добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут на шейкере с регулируемой температурой при 25°C и 300 об/мин. После промывки добавляли предварительно разведенное в PBS-T козье антитело против IgG человека с Fcy-HRP и инкубировали в течение 60 минут на шейкере с регулируемой температурой при 25°C и 300 об/мин. Для обнаружения после промывки планшета в планшет для анализа добавляли ABTS и затем инкубировали в течение 30 минут на шейкере с регулируемой температурой при 25°C и 300 об/мин. Добавляли 2% щавелевую кислоту (без промывки) для остановки ферментативной реакции. Считывание и анализ проводили при 405 нм.

Таблица 26. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия №. А, Температура хранения 5±3°C – НЕПЕРЕВЕРНУТЫЙ

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)		
		0	3	6
Внешний вид	Внешний вид раствора	Слабо желтый раствор, прозрачный, без видимых частиц	соответствует	соответствует
Цвет	Степень окрашивания	≤ Y6	≤ Y7	≤ Y6
опалесценция	Степень опалесценции	≤ RSI	≤ RSI	≤ RSI
частицы, невидимые невооружённым глазом	Количество частиц на сосуд: ≥ 25 мкм ≥ 10 мкм ≥ 5 мкм ≥ 2 мкм	0 25 309 1816	13 52 919 8557	367 418 1417 8557
CE-SDS (восст.)	IgG в виде HC + LC	99,1%	99,0%	98,9%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG Сравнение с референсным стандартом	91,5% CR	91,4% CR	91,3% CR
icIEF	% кислотных изоформ % основного пика % основных изоформ <sup>1</sup>	29,8% 67,0% < LOQ	29,8% 66,9% < LOQ	29,4% 67,4% 3,2%*
SE-HPLC	% мономера	98,6%	98,6%	98,7%

	% HMWS % LMWS <sup>2</sup>	1,4% < LOQ	1,4% < LOQ	1,3% < LOQ
ELISA	% относительно референсного стандарта	102%	103%	105%
Эффективность	% относительно референсного стандарта	99%	86%	113%
A280	Концентрация белка	20,2 мг/мл	20,2 мг/мл	20,2 мг/мл
pH	pH	6,0	6,0	6,0
HC: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LOQ: предел количественного определения. LMWS: низкомолекулярные соединения. RS: референсная суспензия. Y: Желтый. CR: По сравнению с референсным стандартом.				
1.	LOQ равен 4,9%.			
2.	LOQ равен 0,1%.			

Таблица 27. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия №. А, Температура хранения 5±3°C – ПЕРЕВЕРНУТЫЙ.

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)		
		0	3	6
Внешний вид	Внешний вид раствора	Слабо желтый раствор, прозрачный, без видимых частиц	Соответствует	≤ Y6
Цвет	Степень окрашивания	≤ Y6	≤ Y7	≤ Y6
Опалесценция	Степень опалесценции	≤ RSII	≤ RSI	≤ RSI
Частицы, невидимые невооружённым глазом	Количество частиц на сосуд: ≥ 25 мкм ≥ 10 мкм ≥ 5 мкм ≥ 2 мкм	0 25 309 1816	160 194 1022 7438	33 82 1031 7266
CE-SDS (восст.)	IgG в виде HC + LC	99,1%	98,7%	98,9%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG Сравнение референсным стандартом	91,5% CR	91,6% CR	91,1% CR
icIEF	% кислотных изоформ % основного пика % основных изоформ <sup>1</sup>	29,8% 67,0% < LOQ	31,2% 65,5% < LOQ	29,5% 67,4% 3,1%*
SE-HPLC	% мономера % HMWS % LMWS <sup>2</sup>	98,6% 1,4% < LOQ	98,6% 1,4% < LOQ	98,7% 1,3% < LOQ
ELISA	% относительно референсного стандарта	102%	105%	107%
Эффективность	% относительно референсного стандарта	99%	101%	103%
A280	Концентрация белка	20,2 мг/мл	20,2 мг/мл	20,2 мг/мл
pH	pH	6,0	6,0	6,0

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)
НС: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LOQ: предел количественного определения. LMWS: низкомолекулярные соединения. RS: референсная суспензия. Y: Желтый. CR: По сравнению с референсным стандартом.		
1.	LOQ равен 4,9%.	
2.	LOQ равен 0,1%.	

Таблица 28. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия №. А, температура хранения 25±2°C / 60±5% RH

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)			
		0	2	3	6
Внешний вид	Внешний вид раствора	Слабо желтый раствор, прозрачный, без видимых частиц	соответствует	соответствует	соответствует
Цвет	Степень окрашивания	≤ Y6	≤ Y7	≤ Y7	≤ Y6
Опалесценция	Степень опалесценции	≤ RSII	≤ RSI	≤ RSI	≤ RSI
Частицы, невидимые невооружённым глазом	Количество частиц на сосуд:				
	≥ 25 мкм	0	84	10	6
	≥ 10 мкм	25	198	72	126
	≥ 5 мкм	309	1515	1129	2248
	≥ 2 мкм	1816	7572	7782	33908
CE-SDS (восст.)	IgG в виде НС + LC	99,1%	98,5%	98,5%	97,6%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG Сравнение с референсным стандартом	91,5% CR	90,9% CR	90,7% CR	89,6% CR
icIEF	% кислотных изоформ	29,8%	36,8%	38,1%	45,0%
	% основного пика	67,0%	60,2%	59,1%	52,1%
	% основных изоформ <sup>1</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,9%*
SE-HPLC	% мономера	98,6%	98,6%	98,5%	98,3%
	% HMWS	1,4%	1,3%	1,3%	1,3%
	% LMWS <sup>2</sup>	< LOQ	0,1%	0,2%	0,4%
ELISA	% относительно референсного стандарта	102%	107%	105%	104%
Эффективность	% относительно референсного стандарта	99%	89%	84%	113%
A280	Концентрация белка (мг/мл)	20,2 мг/мл	20,3 мг/мл	20,1 мг/мл	20,2 мг/мл
pH	pH	6,0	5,9 <sup>3</sup>	6,1	6,0
НС: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LOQ: предел количественного определения. LMWS: низкомолекулярные соединения. RS: референсная					

Тест	Параметр	Временная точка (месяцы)
суспензия. Y: Желтый. CR: По сравнению с референсным стандартом.		
1.	LOQ равен 4,9%.	
2.	LOQ равен 0,1%.	
3.	Репрезентативное значение тетроспективного тестирования pH TP=2m.	

Таблица 29. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия № В, Температура хранения  $\leq -65^{\circ}\text{C}$

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)			
		0	1	2	3
Цвет	Степень окрашивания	BY6 BY7	– BY7	B7 – B8	BY7
Опалесценция	Степень опалесценции	RSI	RSI RSII	– RSI	RSI RSII
CE-SDS (восст.)	IgG в виде HC + LC	98,5%	99,0%	99,0%	98,8%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG	91,3%	91,1%	91,2%	91,9%
icIEF	% кислотных изоформ	27,0%	26,6%	30,5%	30,4%
	% основного пика	70,3%	70,8%	66,4%	66,1%
	% основных изоформ <sup>1</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SE-HPLC	% мономера	98,6%	98,7%	98,7%	98,6%
	% HMWS	1,4%	1,3%	1,3%	1,4%
	% LMWS <sup>2</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
ELISA	% относительно референсного стандарта	93%	103%	113%	99%
Эффективность	% относительно референсного стандарта	NT <sup>3</sup>	NT <sup>3</sup>	106%	95%
A280	Концентрация белка (мг/мл)	20,2 мг/мл	20,5 мг/мл	20,4 мг/мл	20,1 мг/мл
pH	pH	6,0	6,0	5,9	6,0
HC: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LMWS: низкомолекулярные соединения. NT: Не протестировано. RS: референсная суспензия. BY: Коричнево-желтый. В: Коричневый.					
1.	LOQ равен 4,9%.				
2.	LOQ равен 0,1%.				
3.	Без тестирования эффективности при TP=0m и TP=1m из-за непрерывной валидации анализа эффективности.				

Таблица 30. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия № В, Температура хранения  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)			
		0	1	2	3
Цвет	Степень окрашивания	BY6 BY7	– BY7	B7	BY7
Опалесценция	Степень опалесценции	RSI	RSI RSII	– RSI	RSI RSII
CE-SDS (восст.)	IgG в виде HC + LC	98,5%	98,9%	99,0%	98,7%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG	91,3%	91,0%	91,1%	91,8%
icIEF	% кислотных изоформ	27,0%	27,0%	30,3%	29,9%
	% основного пика	70,3%	70,3%	66,5%	66,0%
	% основных изоформ <sup>1</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SE-HPLC	% мономера	98,6%	98,7%	98,7%	98,6%
	% HMWS	1,4%	1,3%	1,3%	1,4%
	% LMWS <sup>2</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
ELISA	% относительно референсного стандарта	93%	108%	113%	102%

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)			
		0	1	2	3
Эффективность	% относительно референсного стандарта	NT <sup>3</sup>	90%	95%	89%
A280	Концентрация белка (мг/мл)	20,2 мг/мл	20,5 мг/мл	20,4 мг/мл	20,1 мг/мл
pH	pH	6,0	6,0	5,9	6,0
НС: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LMWS: низкомолекулярные соединения. RS: референсная суспензия. BY: Коричнево-желтый. В: Коричневый.					
1.	LOQ равен 4,9%.				
2.	LOQ равен 0,1%.				
3.	Без тестирования эффективности при TP=0m и TP=1m из-за непрерывной валидации анализа эффективности.				

Таблица 31. Данные по стабильности для IgG1-C-E430G, партия №. В, Температура хранения 25±2°C / 60±5% RH

Тест	Параметр теста	Временная точка (месяцы)			
		0	1	2	3
Цвет	Степень окрашивания	BY6 BY7	– BY7	B7	BY7
Опалесценция	Степень опалесценции	RSI	RSI RSII	RSI	RSI RSII
CE-SDS (восст.)	IgG в виде HC + LC	98,5%	98,9%	98,6%	98,5%
CE-SDS (невосст.)	Интактные IgG	91,3%	90,8%	90,7%	91,2%
icIEF	% кислотных изоформ	27,0%	28,8%	34,1%	35,6%
	% основного пика	70,3%	68,7%	63,1%	60,5%
	% основных изоформ <sup>1</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SE-HPLC	% мономера	98,6%	98,7%	98,7%	98,5%
	% HMWS	1,4%	1,2%	1,2%	1,3%
	% LMWS <sup>2</sup>	< LOQ	0,1%	0,1%	0,2%
Связывание антигена	% относительно референсного стандарта	93%	106%	112%	110%
Эффективность	% относительно референсного стандарта	NT <sup>3</sup>	94%	92%	90%
A280	Концентрация белка (мг/мл)	20,2 мг/мл	20,5 мг/мл	20,4 мг/мл	20,1 мг/мл
pH	pH	6,0	5,9	6,0	6,0
НС: Тяжелая цепь. HMWS: высокомолекулярные соединения. LC: Легкая цепь. LMWS: низкомолекулярные соединения. RS: референсная суспензия. BY: Коричнево-желтый. В: Коричневый.					
1.	LOQ равен 4,9%.				
2.	LOQ равен 0,1%.				
3.	Без тестирования эффективности при TP=0m и TP=1m из-за непрерывной валидации анализа эффективности.				

### Список литературы

Каждый источник в этом списке или цитируемый где-либо в данном описании полностью включен в него в качестве ссылки.

Antonelli, A., P. Fallahi, et al. (2001). «Anti-CD38 autoimmunity in patients with chronic autoimmune thyroiditis or Graves' disease.» Clin Exp Immunol 126(3): 426-431.

Ausiello, C. M., F. Urbani, et al. (2000). «Functional topography of discrete domains of



human CD38.» *Tissue Antigens* 56(6): 539-547.

Brezski, R. J. and G. Georgiou (2016). «Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering.» *Curr Opin Immunol* 40: 62-69.

Chatterjee, S., A. Daenthansanmak, et al. (2018). «CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response.» *Cell Metab* 27(1): 85-100 e108.

Cotner, T., M. Hemler, et al. (1981). «Human T cell proteins recognized by rabbit heteroantisera and monoclonal antibodies.» *Int J Immunopharmacol* 3(3): 255-268.

Dall'Acqua, W. F., K. E. Cook, et al. (2006). «Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region.» *J Immunol* 177(2): 1129-1138.

Damle, R. e. a. (1999). «Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.» *Blood* 94(6): 1840-1847.

de Weers, M., Y. T. Tai, et al. (2011). «Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors.» *J Immunol* 186(3): 1840-1848.

Deckert, J., M. C. Wetzel, et al. (2014). «SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies.» *Clin Cancer Res* 20(17): 4574-4583.

Deshpande, D. A., T. A. White, et al. (2005). «Altered airway responsiveness in CD38-deficient mice.» *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(2): 149-156.

Desjarlais, J. R. and G. A. Lazar (2011). «Modulation of antibody effector function.» *Exp Cell Res* 317(9): 1278-1285.

Eissler, N., S. Filosto, et al. (2018). «A best in class anti-CD38 antibody with antitumor and immune-modulatory properties.» AACR annual meeting 2018: Abstract #3812.

Feng X., Zhang L., et al. (2017). «Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma.» *Clin Cancer Res* 23:4290-4300.

Ho, H. N., L. E. Hultin, et al. (1993). «Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens.» *J Immunol* 150(7): 3070-3079.

Kaneko, E. and R. Niwa (2011). «Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering.» *BioDrugs* 25(1): 1-11.

Karakasheva T. A., Waldron T. J., et al., (2015). «CD38-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Tumor Growth in a Murine Model of Esophageal Cancer.» *Cancer Res* 75(19):4074-85

Kestens, L., G. Vanham, et al. (1992). «Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection.» *AIDS* 6(8): 793-797.

Keyhani, A., Y. O. Huh, et al. (2000). «Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia.» *Leuk Res* 24(2): 153-159.

Konoplev, S., L. J. Medeiros, et al. (2005). «Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia.» *Am J Clin Pathol* 124(3): 414-420.

Krejciak, J., T. Casneuf, et al. (2016). «Daratumumab depletes CD38+ immune-regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma.» *Blood* 128: 384-394.

Krejciak, J., K. A. Frerichs, et al. (2017). «Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab.» *Clin Cancer Res* 23(24): 7498-7511.

Lammerts van Bueren, J., D. Jakobs, et al. (2014). «Direct in Vitro Comparison of Daratumumab with Surrogate Analogs of CD38 Antibodies MOR03087, SAR650984 and Ab79.» *Blood* 124(21): 3474.

Lande, R., F. Urbani, et al. (2002). «CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes.» *Cell Immunol* 220(1): 30-38.

Lee, H. C. and R. Aarhus (1993). «Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose.» *Biochim Biophys Acta* 1164(1): 68-74.

Lin, P., R. Owens, et al. (2004). «Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma.» *Am J Clin Pathol* 121(4): 482-488.

Malavasi, F., A. Funaro, et al. (1994). «Human CD38: a glycoprotein in search of a function.» *Immunol Today* 15(3): 95-97.

Mallone, R. and P. C. Perin (2006). «Anti-CD38 autoantibodies in type 2 diabetes.» *Diabetes Metab Res Rev* 22(4): 284-294.

Marinov, J., K. Koubek, et al. (1993). «Immunophenotypic Significance of the Lymphoid Cd38 Antigen in Myeloid Blood Malignancies.» *Neoplasma* 40(6): 355-358.

Morandi F., Horenstein A. L., et al. (2015). «CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4<sup>+</sup> T Cell Proliferation.» *J Immunol* 195:965-972.

Moore, G. L., H. Chen, et al. (2010). «Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions.» *MAbs* 2(2): 181-189.

Patton, D. T., Wilson M. D., et al. (2011). «The PI3K p110 $\delta$  Regulates Expression of CD38 on Regulatory T cells.» *PLoS ONE* 6(3): 1-8

Parry-Jones, N., E. Matutes, et al. (2007). «Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and

may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH.» *Br J Haematol* 137(2): 117-124.

Perfetti, V., V. Bellotti, et al. (1994). «AL amyloidosis. Characterization of amyloidogenic cells by anti-idiotypic monoclonal antibodies.» *Lab Invest* 71(6): 853-861.

Raab, M. S., H. Goldschmidt, et al. (2015). «A phase I/IIa study of the human anti-CD38 antibody MOR202 (MOR03087) in relapsed or refractory multiple myeloma (rrMM).» *J Clin Oncol* 33: A8574.

Ramaschi, G., M. Torti, et al. (1996). «Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane.» *Blood* 87(6): 2308-2313.

Roepcke, S., N. Plock, et al. (2018). «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytolytic anti-CD38 human monoclonal antibody TAK-079 in monkey - model assisted preparation for the first in human trial.» *Pharmacol Res Perspect* 6(3): e00402.

Schooten, W. v. (2018). «Multispecific antibodies targeting CD38 and PD-L1 show potent tumor cytotoxicity.» *AACR annual meeting 2018: Abstract #5620*.

Sondermann, P. and D. E. Szymkowski (2016). «Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies.» *Curr Opin Immunol* 40: 78-87.

Song, A., K. Myojo, et al. (2014). «Evaluation of a fully human monoclonal antibody against multiple influenza A viral strains in mice and a pandemic H1N1 strain in nonhuman primates.» *Antiviral Res* 111: 60-68.

Suzuki, R., J. Suzumiya, et al. (2004). «Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells.» *Leukemia* 18(4): 763-770.

van de Donk (2018). «Immunomodulatory effects of CD38 targeting antibodies.» *Immunology Letters* 199:16-22

van de Donk, N. W., M. L. Janmaat, et al. (2016). «Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond.» *Immunol Rev* 270(1): 95-112.

van de Donk, N. W., H. M. Lokhorst, et al. (2012). «How I treat plasma cell leukemia.» *Blood* 120(12): 2376-2389.

Wang, L., H. Wang, et al. (2015). «CD38 expression predicts poor prognosis and might be a potential therapy target in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type.» *Ann Hematol* 94(8): 1381-1388.

Wang, X., M. Mathieu, et al. (2018). «IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions.» *Protein & Cell* 9(1): 63-73.

Zhang, D., A. A. Armstrong, et al. (2017). «Functional optimization of agonistic antibodies to OX40 receptor with novel Fc mutations to promote antibody multimerization.» *MAbs* 9(7): 1129-1142.

Zocchi, E., L. Franco, et al. (1993). «A single protein immunologically identified as

CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes.» *Biochem Biophys Res Commun* 196(3): 1459-1465.

Nijhof et al., *Blood* 2016; 128(7):959-970

”Supplemental Methods» to Nijhof et al., 2016

WO 2006/099875 A1 (Genmab A/S)

WO 2007/042309 A1 (Morphosys AG)

WO 2008/047242 A1 (Sanofi Aventis)

WO 2011/154453 A1 (Genmab A/S)

WO 2012/092612 A1 (Takeda Pharmaceutical)

WO 2013/004842 A2 (Genmab A/S)

WO 2014/108198 A1 (Genmab B.V.)

WO 2016/210223 A1 (Janssen Biotech, Inc.)

WO 2018/031258 A1 (Janssen Biotech, Inc.)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая
  - a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего
    - антигенсвязывающий участок, содержащий VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:3 NO:4, VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7, и
      - Fc-область, включающую мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из группы, соответствующей E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU;
    - b) 5-40 мМ гистидина или ацетата;
    - c) 100 – 400 мМ сорбитола или сахарозы; и
    - d) поверхностно-активное вещество.
  2. Фармацевтическая композиция по п. 1, состоящая, по существу, из (a), (b), (c) и (d).
  3. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1 и 2, состоящая из (a), (b), (c) и (d) в водном растворе.
  4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что антитело содержит
    - переменную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO:1 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности, например, 90%, или 95%, или 97%, или 98%, или 99%, с SEQ ID NO: 1; и/или
    - переменную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO:5, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности, например, 90%, или 95%, или 97%, или 98%, или 99%, с SEQ ID NO:5.
  5. Фармацевтическая композиция по п. 4, отличающаяся тем, что в антителе
    - VH отличается от SEQ ID NO:1 на 12 или менее, например, на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ий), таких, как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков; и/или
    - VL отличается от SEQ ID NO:5 на 12 или менее, например, на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.
  6. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов., отличающаяся тем, что указанное антитело содержит VH-область, включающую

последовательность SEQ ID NO:1, и VL-область, включающую последовательность SEQ ID NO:5.

7. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов., отличающаяся тем, что в антителе мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках выбрана из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W, например, из группы, соответствующей E430G, E345K, E430S и E345Q.

8. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что мутация в одном или нескольких аминокислотных остатках включает или состоит из E430G.

9. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Fc-область содержит одну или несколько дополнительных мутаций в аминокислотных остатках, отличных от тех, которые соответствуют E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, и

отличающаяся тем, что одна или несколько дополнительных мутаций не снижают комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и/или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), индуцированную антителом без одной или более дополнительных мутаций.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, отличающаяся тем, что одна или более дополнительных мутаций представляют собой 12 или менее, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.

11. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что в антителе отсутствует аминокислотный остаток, соответствующий Lys (K) в положении 447 тяжелой цепи IgG1 человека, при этом аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

12. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Fc-область представляет собой, за исключением указанных мутаций, изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или их смешанный изотип.

13. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Fc-область представляет собой, за исключением указанных мутаций, Fc-область IgG1 человека, такую как аллотип IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(z) человека или смешанный аллотип любых двух или более из указанных.

14. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека,

включающую, за исключением указанных мутаций, аминокислотные остатки с 99 по 329 (прямая нумерация) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:45.

15. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека, включающую аминокислотные остатки с 99 по 329 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 или SEQ ID NO:46.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая

a) от 1 до 200 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека, включающего

- тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую VH CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:2, VH CDR2, имеющую последовательность SEQ ID NO:3, VH CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4 и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и
- легкую цепь, включающую VL-область, содержащую VL CDR1, имеющую последовательность SEQ ID NO:6, VL CDR2, имеющую последовательность AAS, и VL CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7;

b) 5-40 mM гистидина или ацетата;

c) 100 – 400 mM сорбитола или сахарозы; и

d) поверхностно-активное вещество.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, состоящая, по существу, из (a), (b), (c) и (d).

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16 и 17, состоящая из (a), (b), (c) и (d) в водном растворе.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-18, отличающаяся тем, что антитело содержит

- тяжелую цепь, включающую VH-область, содержащую SEQ ID NO:1, и CH-область IgG1 человека с мутацией в одном или нескольких аминокислотных остатках, выбранных из E430, E345 и S440, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, и

- легкую цепь, включающую VL, содержащую SEQ ID NO:5.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-19, отличающаяся тем, что мутация включает или состоит из E430G.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-20, отличающаяся тем, что

СН-область IgG1 человека представляет собой, за исключением указанных мутаций, аллотип IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(x) или IgG1m(z), или смешанный аллотип любых двух или более из указанных.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-21, отличающаяся тем, что СН-область IgG1 человека содержит, за исключением указанных мутаций, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:45.

23. Фармацевтическая композиция по п. 22, отличающаяся тем, что СН-область IgG1 человека содержит одну или несколько дополнительных мутаций в аминокислотных остатках, отличных от тех, которые соответствуют E430, E345 и S440 в тяжелой цепи IgG1 человека, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, необязательно где указанная одна или более дополнительных мутаций представляют собой 12 или менее, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию(ий), таких как замены, вставки или делеции аминокислотных остатков.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 15-23, отличающаяся тем, что СН-область содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 46.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что СН-область содержит SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 46, при этом легкая цепь необязательно включает CL, содержащую SEQ ID NO: 37.

26. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-25, отличающаяся тем, что в антителе отсутствует аминокислотный остаток, соответствующий Lys (K) в положении 447 в тяжелой цепи IgG1 человека, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU.

27. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-26, которая представляет собой бивалентное антитело.

28. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой, за исключением указанной(ых) мутации(ий), человеческое моноклональное полноразмерное моноспецифическое бивалентное антитело IgG1m(f), к.

29. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что а) составляет от 1 до 80 мг/мл, например, от 1 до 60 мг/мл, от 1 до 40 мг/мл, от 1 до 30 мг/мл или от 1 до 25 мг/мл; от 2 до 80 мг/мл, например, от 2 до 40 мг/мл или от 2 до 30 мг/мл; или от 10 до 80 мг/мл, например, от 10 до 40 мг/мл или от 10 до 30 мг/мл; или от 15 до 80 мг/мл, например, от 15 до 40 мг/мл, например, от 15 до 25



мг/мл, например, 2 мг/мл, 4 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл, 10 мг /мл, 12 мг/мл, 14 мг/мл, 16 мг/мл, 18 мг/мл, 20 мг/мл, 22 мг/мл, 24 мг/мл, 26 мг/мл, 28 мг/мл, 30 мг /мл, 32 мг/мл, 34 мг/мл, 36 мг/мл, 38 мг/мл, 40 мг/мл или 50 мг/мл; предпочтительно около 20 мг/мл, например, 20 мг/мл антителя.

30. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что b) составляет от 5 до 30 mM, например, от 5 до 25 mM, например, 10 mM, 11, mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM., 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM или 30 mM; предпочтительно около 20 mM, например, 20 mM гистидина или ацетата, например, гистидина.

31. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что c) составляет от 100 до 350 mM, например, от 100 до 300 mM, от 100 до 260 mM, от 100 до 200 mM, от 150 до 350 mM, от 200 до 300 mM, от 200 до 260 mM, от 200 до 350 mM, от 200 до 300 mM, от 200 до 260 mM, от 230 до 350 mM, от 230 до 300 mM, от 230 до 260 mM или от 240 до 260 mM; например, 245 mM, 246 mM, 247 mM, 248 mM, 249 mM, 250 mM, 251 mM, 252 mM, 253 mM, 254 mM или 255 mM, предпочтительно около 250 mM, например, 250 mM сорбитола или сахарозы, например, сорбитола.

32. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что pH фармацевтической композиции составляет от 5,0 до 6,5, например, от 5,5 до 6,5, например, от 5,6 до 6,5, от 5,7 до 6,5, от 5,8 до 6,5, от 5,9 до 6,5, от 6,0 до 6,5., от 5,5 до 6,4, от 5,5 до 6,3, от 5,5 до 6,2, от 5,5 до 6,1, от 5,5 до 6,0, от 5,7 до 6,3, от 5,8 до 6,2, от 5,9 до 6,1, например, около 6, например, 6 или 6,0.

33. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество выбрано из группы, включающей моноолеат глицерина, хлорид бензетония, докузат натрия, фосфолипиды, простые алкиловые эфиры полиэтилена, лаурилсульфат натрия и трикаприлин, хлорид бензалкония, цитримид, хлорид цетилпиридиния и фосфолипиды, альфа-токоферол, моноолеат глицерола, миристиловый спирт, фосфолипиды, полочсамеры, алкиловые эфиры полиоксиэтилена, производные полиоксиэтилена и касторового масла, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирных кислот, полиоксиэтиленстераты, полиоксилгидроксистеарат, полиоксиглицериды, полисорбаты, дилаурат пропиленгликоля, монолаурат пропиленгликоля, сложные эфиры сорбитана, пальмитат сахарозы, стеарат сахарозы, трикаприлин и ТПГС.

34. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

35. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или 80, например, полисорбат 80.

36. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,005% до 0,5% масс./об., например, от около 0,01 до 0,1% масс./об., например, от около 0,01 до 0,09% масс./об., например, от около 0,01 до 0,06 % масс./об., например, от около 0,01 до 0,05 % масс./об., например, 0,02 % масс./об., или 0,03 % масс./об., или 0,04 % масс./об., или 0,05 % масс./об. или 0,06% масс./об., например, около 0,04% масс./об. или 0,04% масс./об.

37. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

а) от 1 до 80 мг/мл антитела

б) от 15 до 40 мМ гистидина

с) от 200 до 300 мМ сорбитола

д) от 0,01% до 0,1% масс./об. поверхностно-активного вещества, предпочтительно полисорбата, такого как полисорбат 20, или полисорбат 80, например, полисорбата 80.

38. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

а) от 10 до 40 мг/мл антитела

б) от 15 до 40 мМ гистидина

с) от 200 до 300 мМ сорбитола

д) от 0,02% до 0,06% масс./об. поверхностно-активного вещества, предпочтительно полисорбата, такого как полисорбат 20, или полисорбат 80, например, полисорбата 80.

39. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция имеет рН от 5,9 до 6,1, например, около 6 или 6,0, и содержит или, по существу, состоит из:

а) от 10 до 40 мг/мл антитела

б) от 15 до 25 мМ гистидина

с) от 240 до 260 мМ сорбитола

д) от 0,02% до 0,06% масс./об. поверхностно-активного вещества, предпочтительно полисорбата, такого как полисорбат 20, или полисорбат 80, например, полисорбата 80.

40. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов,

отличающаяся тем, что композиция стабильна в течение по меньшей мере 8 недель, например, в течение периода 1-60 месяцев, 1-48 месяцев, 1-36 месяцев, 1-30 месяцев, 1-24 месяцев, 1-18 месяцев, 1-12 месяцев или 1-6 месяцев; например, в течение 2-60 месяцев, 2-48 месяцев, 2-36 месяцев, 2-30 месяцев, 2-24 месяцев, 2-18 месяцев, 2-12 месяцев или 2-6 месяцев; например, на 3-60 месяцев, 3-48 месяцев, 3-36 месяцев, 3-30 месяцев, 3-24 месяцев, 3-18 месяцев, 3-12 месяцев или 3-6 месяцев, например, на 48 месяцев, 36 месяцев, 30 месяцев, 24 месяца, 18 месяцев, 12 месяцев или 6 месяцев.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, отличающаяся тем, что стабильность определяют, когда композицию выдерживают при  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ , около  $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  или около  $40^{\circ}\text{C}$ , например, при  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

42. Фармацевтическая композиция по п. 40 или 41, отличающаяся тем, что стабильность оценивают с помощью

- (a) подсчета частиц, невидимых невооружённым глазом;
- (b) определения pH;
- (c) определения концентрации белка;
- (d) эксклюзионной хроматографии по размеру;
- (e) изоэлектрического фокусирования;
- (f) электрофореза в восстанавливающих условиях;
- (g) электрофореза в невосстанавливающих условиях; и/или
- (h) визуального осмотра.

43. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 40-42, отличающаяся тем, что стабильность оценивают с помощью

(a) подсчета частиц, невидимых невооружённым глазом, с использованием микроскопа с визуализацией микропотоков (MFI), необязательно, как предусмотрено в Примере 12;

(b) определения pH, необязательно как предусмотрено в Примере 11;

(c) определения концентрации белка с использованием поглощения при 280 нм ( $A_{280}$ ), необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(d) определения относительного количества мономеров антитела по сравнению с суммой мономеров антитела, частиц с высокой молекулярной массой (HMW) и частиц с низкой молекулярной массой (LMW), присутствующих в композиции, с использованием эксклюзионной хроматографии по размеру, необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(e) определения относительного количества антитела по сравнению с суммарным количеством антитела, кислых вариантов антитела и основных вариантов антитела с

помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (icIEF), необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(f) определения относительного количества суммы легкой цепи и тяжелой цепей по сравнению с суммой легкой цепи, тяжелой цепи и негликозилированной тяжелой цепи по данным капиллярного электрофореза в восстанавливающих условиях, необязательно, как предусмотрено в Примере 11;

(g) определения относительного количества пика антитела по сравнению с суммой пиков антител, пиков с молекулярными массами ниже пика антител и пиков с молекулярными массами выше пика антител; и/или

(h) определения внешнего вида, необязательно как предусмотрено в Примере 11.

44. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело способно связываться с His-меченным CD38 человека, имеющим SEQ ID NO: 39.

45. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело оказывает ингибирующее действие на циклазную активность CD38 человека.

46. Фармацевтическая композиция по п. 45, отличающаяся тем, что указанное антитело ингибирует циклазную активность CD38 человека по меньшей мере на около 40%, например, по меньшей мере на около 50%, например, по меньшей мере на около 60%, при этом необязательно определяется ингибирование циклазной активности с помощью анализа, включающего стадии:

a) посев 200 000 клеток Daudi или Wien133 в 100 мкл 20 mM Трис-HCL на лунку; или внесение 0,6 мкг/мл His-меченного растворимого CD38 человека (SEQ ID NO:39) в 100 мкл 20 mM Трис-HCL на лунку в многолуночный планшет;

b) добавление 1 мкг/мл CD38-антитела и 80 мкМ NGD в каждую лунку;

c) измерение флуоресценции до достижения плато (например, 5, 10 или 30 минут);

и

d) определение процентного ингибирования по сравнению с контролем, например, в лунке, инкубированной с контрольным изотипическим антителом.

47. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело индуцирует апоптоз в присутствии, но не в отсутствие Fc-перекрестно-связывающего антитела.

48. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело индуцирует КЗЦ, АЗКЦ, антителозависимый клеточный фагоцитоз (АКФ), тромбоцитоз или любую их комбинацию в клетках,

экспрессирующих CD38 человека.

49. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело индуцирует КЗЦ в клетках, экспрессирующих CD38 человека.

50. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное антитело индуцирует КЗЦ в клетках Daudi (ATCC No. CCL-213) или клетках Ramos (ATCC No. CRL-1596), что приводит к максимальному лизису по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% более высокому, чем у референсного антитела, отличающегося только отсутствием одной или нескольких мутаций в Fc-области.

51. Фармацевтическая композиция по п. 50, отличающаяся тем, что КЗЦ определяют с помощью анализа, включающего следующие стадии:

а) посев 100 000 CD38-экспрессирующих клеток в 40 мкл культуральной среды с добавлением 0,2% БСА на лунку в многолуночный планшет;

б) предварительная инкубация клеток в течение 20 минут с 40 мкл серийно разведенного CD38-антитела (0,0002-10 мкг/мл);

в) инкубация каждой лунки в течение 45 минут при 37°C с 20% объединенной нормальной человеческой сывороткой;

г) добавление красителя для оценки жизнеспособности и измерение процента лизиса клеток на проточном цитометре;

е) определение максимального лизиса с помощью нелинейной регрессии.

52. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что антитело представляет собой полноразмерное бивалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где

- каждая тяжелая цепь содержит VH-область и CH-область, где VH-область содержит SEQ ID NO:1, а CH-область содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и

- каждая легкая цепь содержит VL-область и CL-область, где VL-область содержит SEQ ID NO:5, а CL-область содержит SEQ ID NO:37.

53. Фармацевтическая композиция, имеющая рН около 6 и содержащая или, по существу, состоящая из:

а) около 20 мг/мл антитела, связывающегося с CD38 человека,

б) около 20 мМ гистидина,

в) около 250 мМ сорбитола и

г) около 0,04% масс./об. полисорбата 80,

при этом антитело представляет собой полноразмерное бивалентное антитело, содержащее, состоящее или, по существу, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где

- каждая тяжелая цепь содержит VH-область и CH-область, где VH-область содержит SEQ ID NO:1, а CH-область содержит SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:46, и

- каждая легкая цепь содержит VL-область и CL-область, где VL-область содержит SEQ ID NO:5, а CL-область содержит SEQ ID NO:37.

54. Фармацевтическая композиция по п. 53, имеющая рН около 6 и содержащая, состоящая или, по существу, состоящая из:

- a) 20 мг/мл антитела,
  - b) 20 mM гистидина,
  - c) 250 mM сорбитола и
  - d) 0,04% масс./об. полисорбата 80,
- в водном растворе.

55. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 52-54, отличающаяся тем, что указанное антитело продуцируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO).

56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 52-55, отличающаяся тем, что антитело получено или может быть получено способом, включающим экспрессию тяжелой цепи и легкой цепей в клетке CHO.

57. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция предназначена для внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

58. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция представляет собой концентрат, подлежащий разбавлению, например, в 0,9% растворе NaCl (физиологический раствор) или растворе декстрозы, необязательно в растворе декстрозы 5% масс./об.

59. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения в качестве лекарственного средства.

60. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения при лечении заболевания, вовлекающего клетки, экспрессирующие CD38.

61. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения для индукции КЗЦ-ответа против опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие CD38.

62. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения при лечении или профилактике рака у субъекта, содержащего клетки,

экспрессирующие CD38 человека.

63. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения при лечении рака, рефрактерного к предшествующей терапии, включающей одно или несколько средств из CD38-антитела, ингибитора протеасом (PI) и иммуномодулирующего лекарственного средства (IMiD).

64. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов для применения при лечении рецидива рака после предшествующей терапии, включающей одно или несколько средств из CD38-антитела, PI и IMiD.

65. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 63 и 64, отличающаяся тем, что CD38-антитело представляет собой даратумаб.

66. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 62-65, отличающаяся тем, что рак представляет собой гематологический рак.

67. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 62-65, отличающаяся тем, что рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, хронического лимфолейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), В-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) и миелодиспластического синдрома (MDS), необязательно где ALL представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-ALL).

68. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 66 и 67, отличающаяся тем, что В-клеточная лимфома выбрана из группы, состоящей из мантийно-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы (FL).

69. Фармацевтическая композиция для применения по п. 66, отличающаяся тем, что гематологический рак выбран из группы, состоящей из множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (у взрослых) (AML), мантийно-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы (FL) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

70. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 62-65, отличающаяся тем, что рак представляет собой солидную опухоль.

71. Фармацевтическая композиция для применения по п. 70, отличающаяся тем, что солидная опухоль представляет собой меланому, рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплюскклеточный NSCLC, колоректальный рак, рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак желудка, рак яичников, желудочный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак пищевода или желудочно-

кишечного тракта, рак молочной железы, рак маточной трубы, рак головного мозга, рак уретры, рак мочеполовой системы, рак эндометрия, рак шейки матки, аденокарциному легкого, почечно-клеточную карциному (RCC) (например, светлоклеточную карциному почки или папиллярно-клеточную карциному почки), мезотелиому, карциному носоглотки (NPC), карциному пищевода или желудочно-кишечного тракта или метастатическое поражение, связанное с любым из них.

72. Антитело для применения по любому из пп. 70 и 71, отличающееся тем, что в солидной опухоли отсутствует определяемая экспрессия CD38.

73. Антитело для применения по любому из пп. 62-72, отличающееся тем, что рак возник у пациента, содержащего регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CD38.

74. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-58 для применения при лечении или профилактике ревматоидного артрита.

75. Способ лечения заболевания, вовлекающего клетки, экспрессирующие CD38, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-58 нуждающемуся в этом пациенту.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в терапевтически эффективном количестве и/или в течение времени, достаточного для лечения заболевания.

77. Способ по любому из пп. 75 и 76, дополнительно включающий признак(и) по любому из пп. 59-73.



```

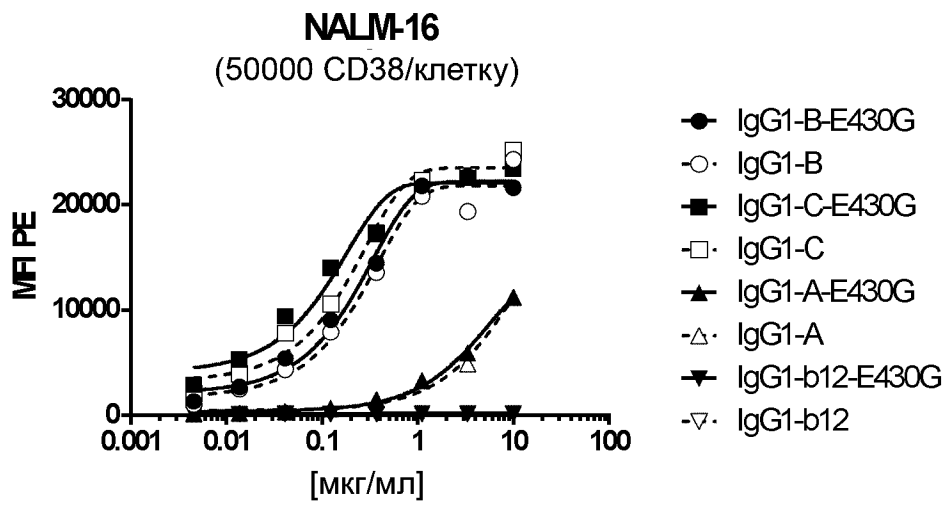
IgG1 247 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL 306
IgG1f 247 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL 306
IgG2 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
IgG3 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVL
IgG4 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
*****:*****:*****:*****:*****

IgG1 307 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT 366
IgG1f 307 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT 366
IgG2 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG3 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG4 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

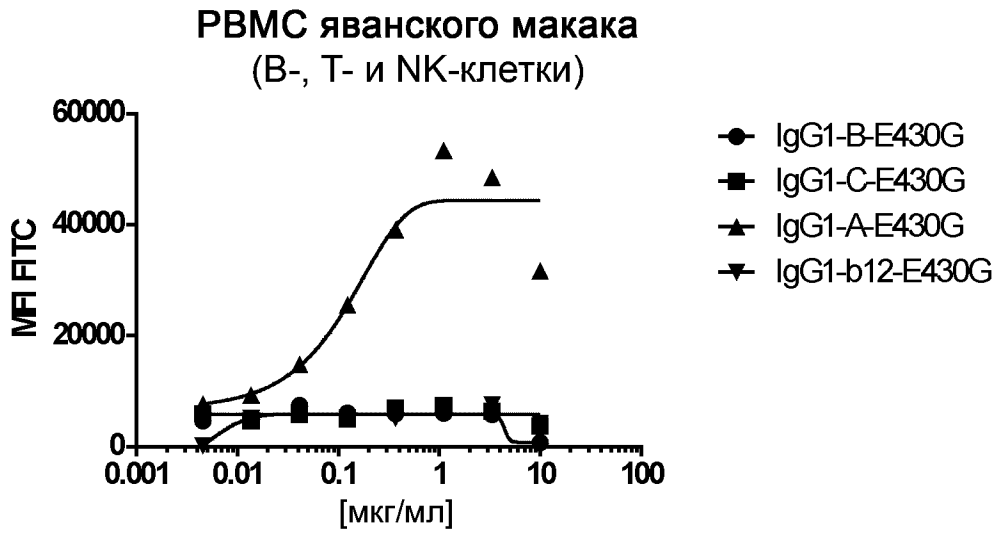
IgG1 367 CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS 426
IgG1f 367 CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS 426
IgG2 CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
IgG3 CLVKGFPYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSC
IgG4 CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

IgG1 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
IgG1f 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
IgG2 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG3 VMHEALHNRFYQKSLSLSPGK
IgG4 VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
*****:***** **
    
```

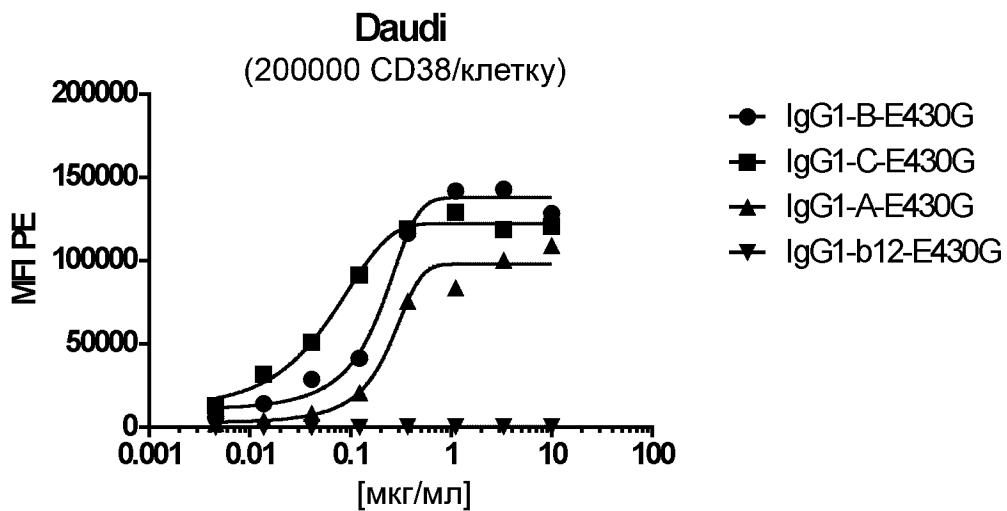
Фиг. 1



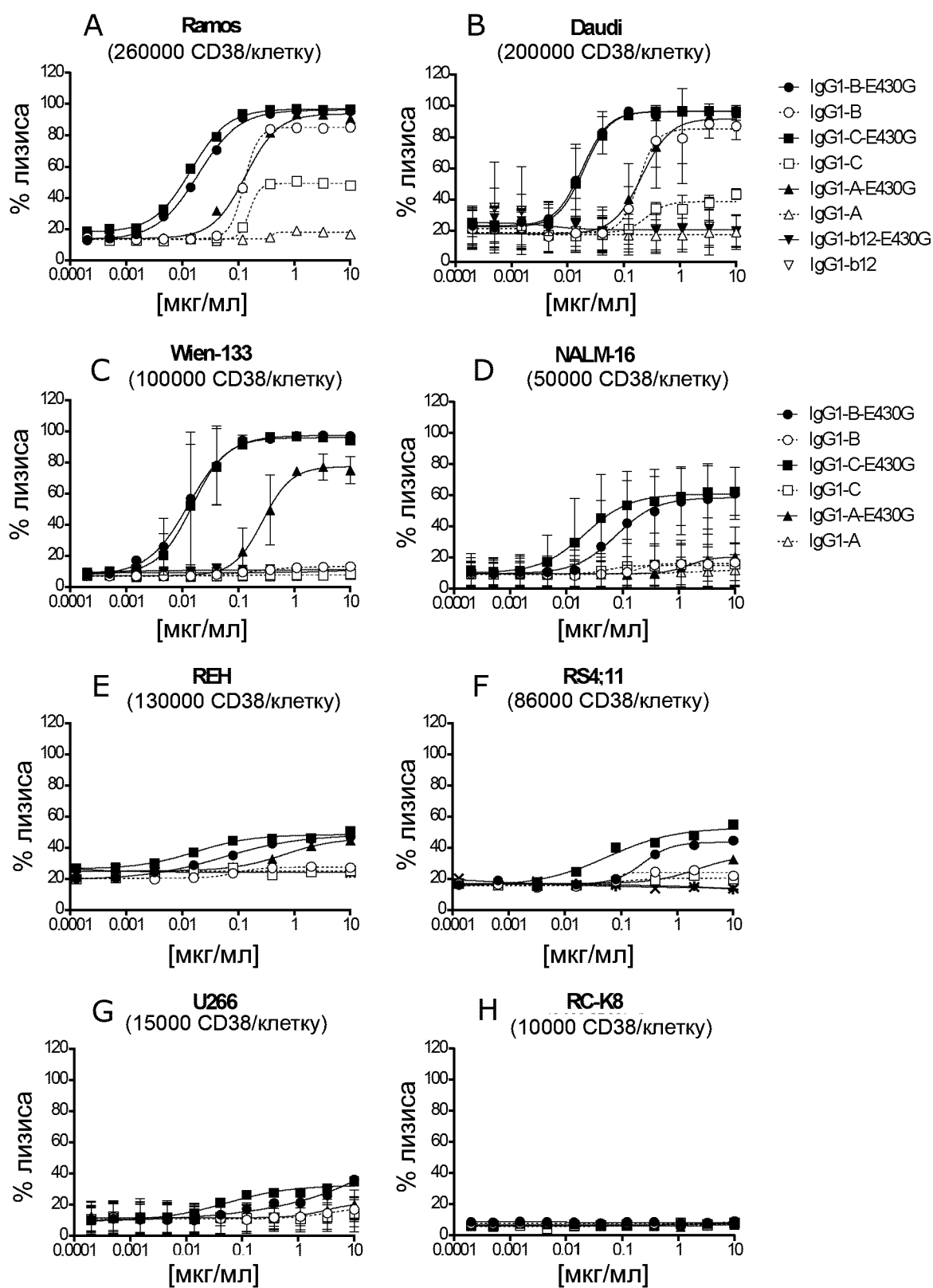
Фиг. 2



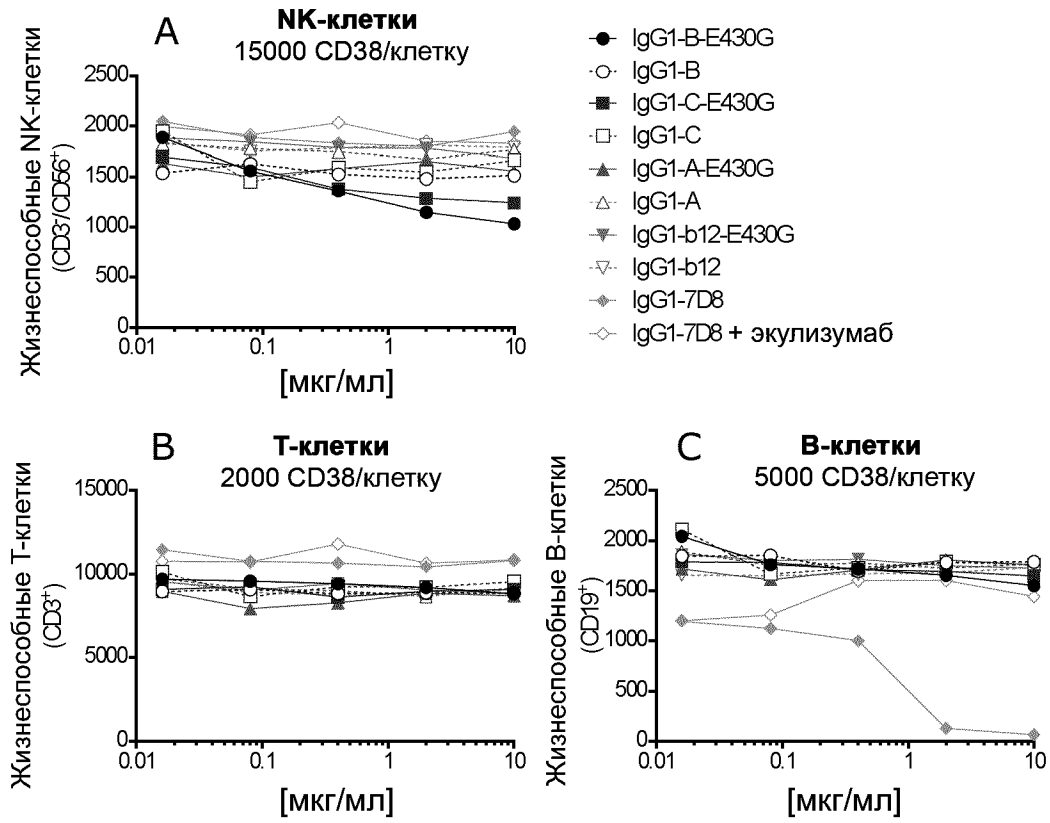
Фиг. 3А



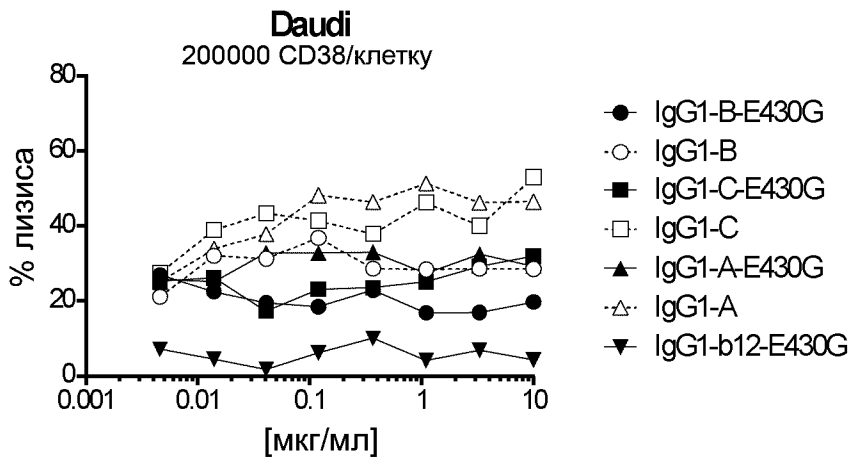
Фиг. 3В



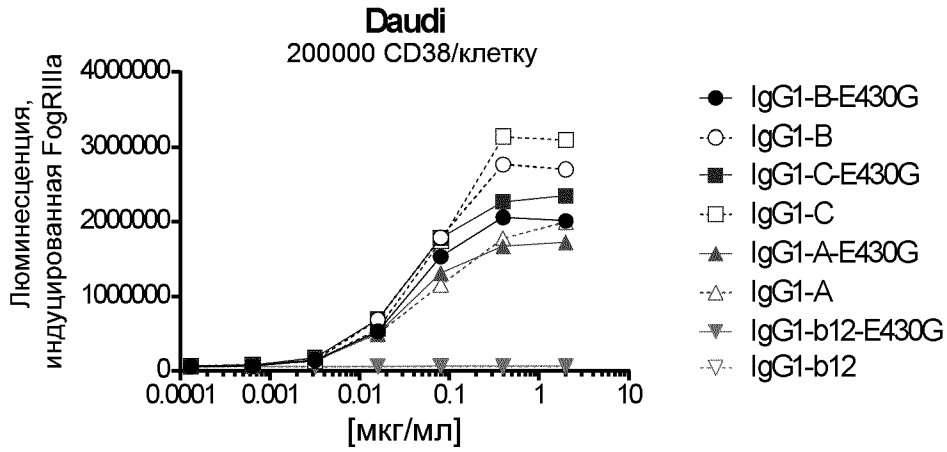
Фиг. 4



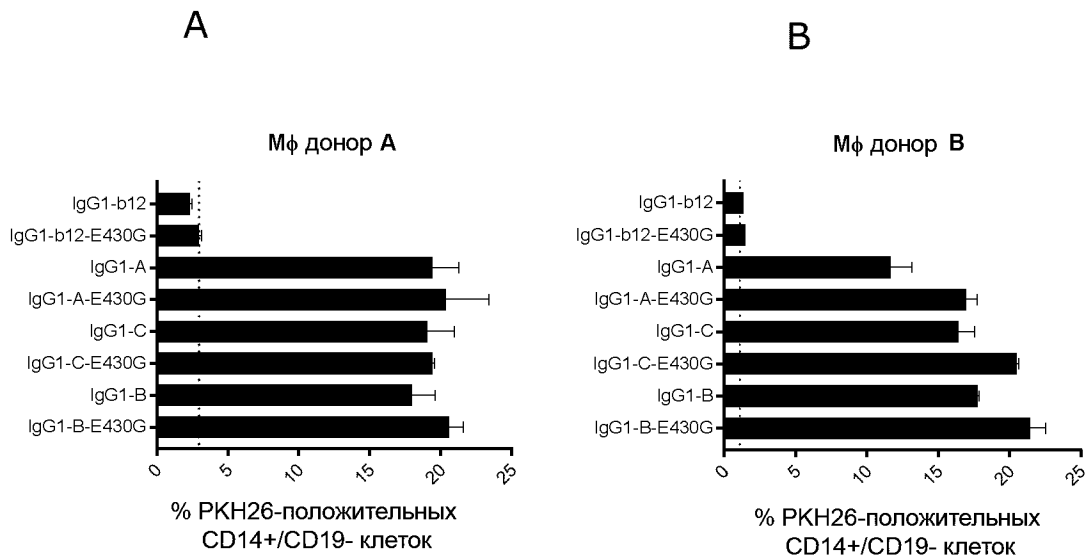
Фиг. 5



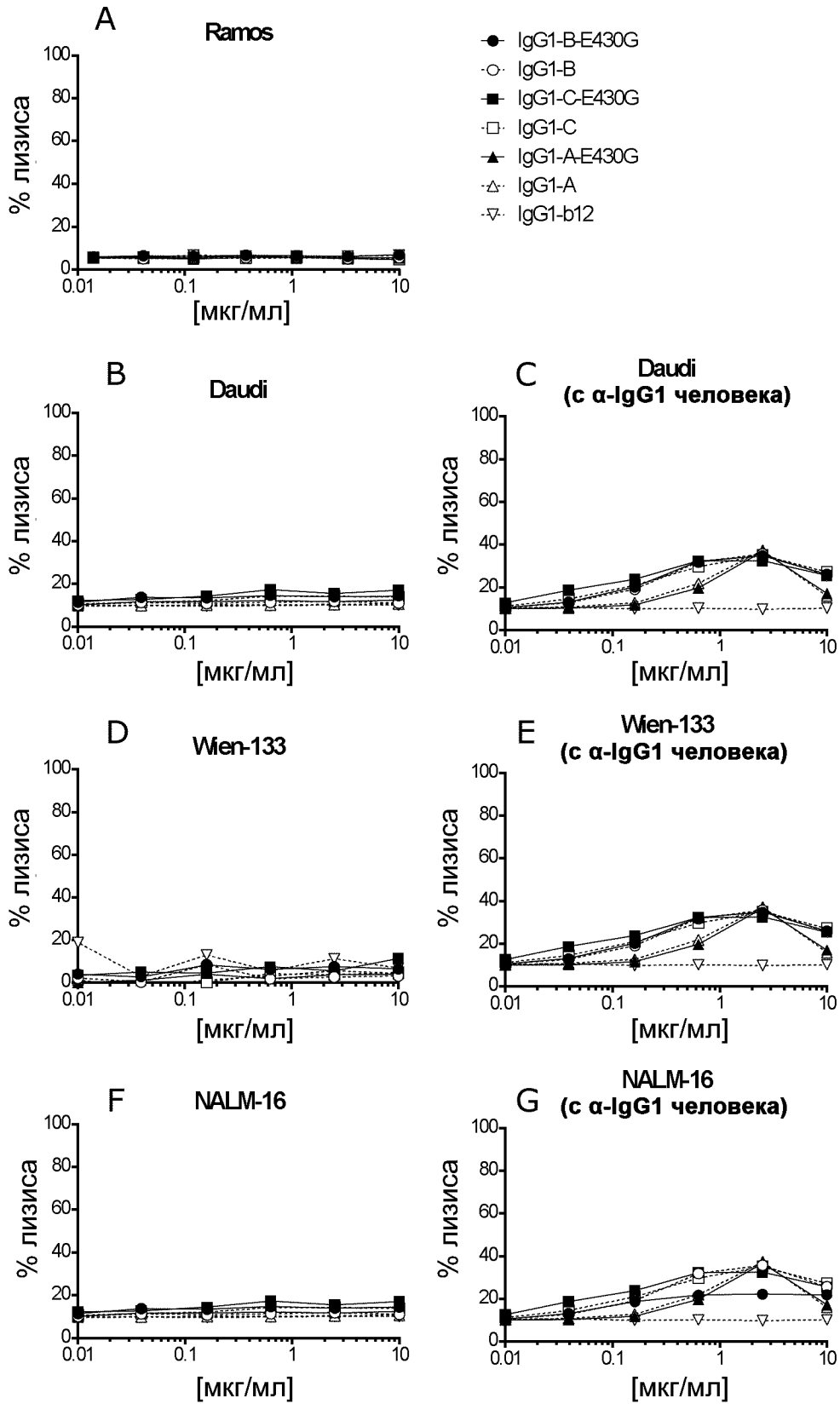
Фиг. 6



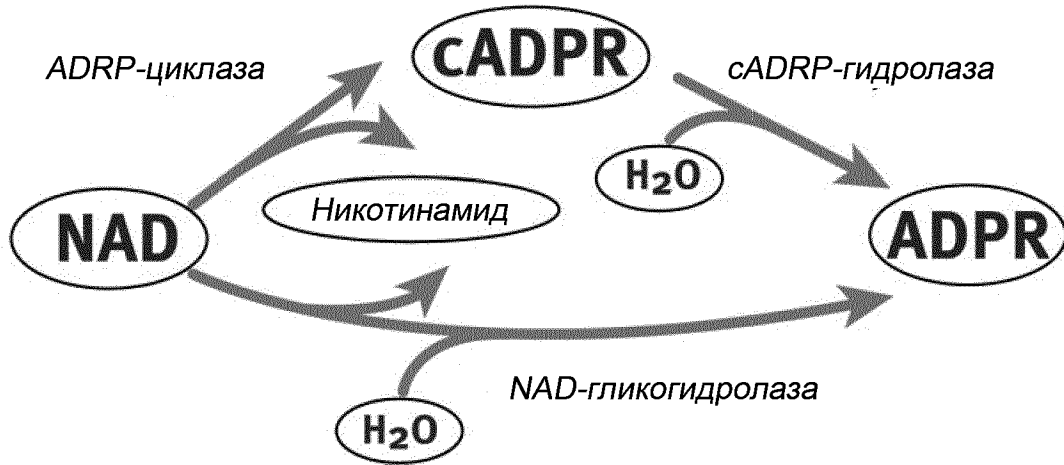
Фиг. 7



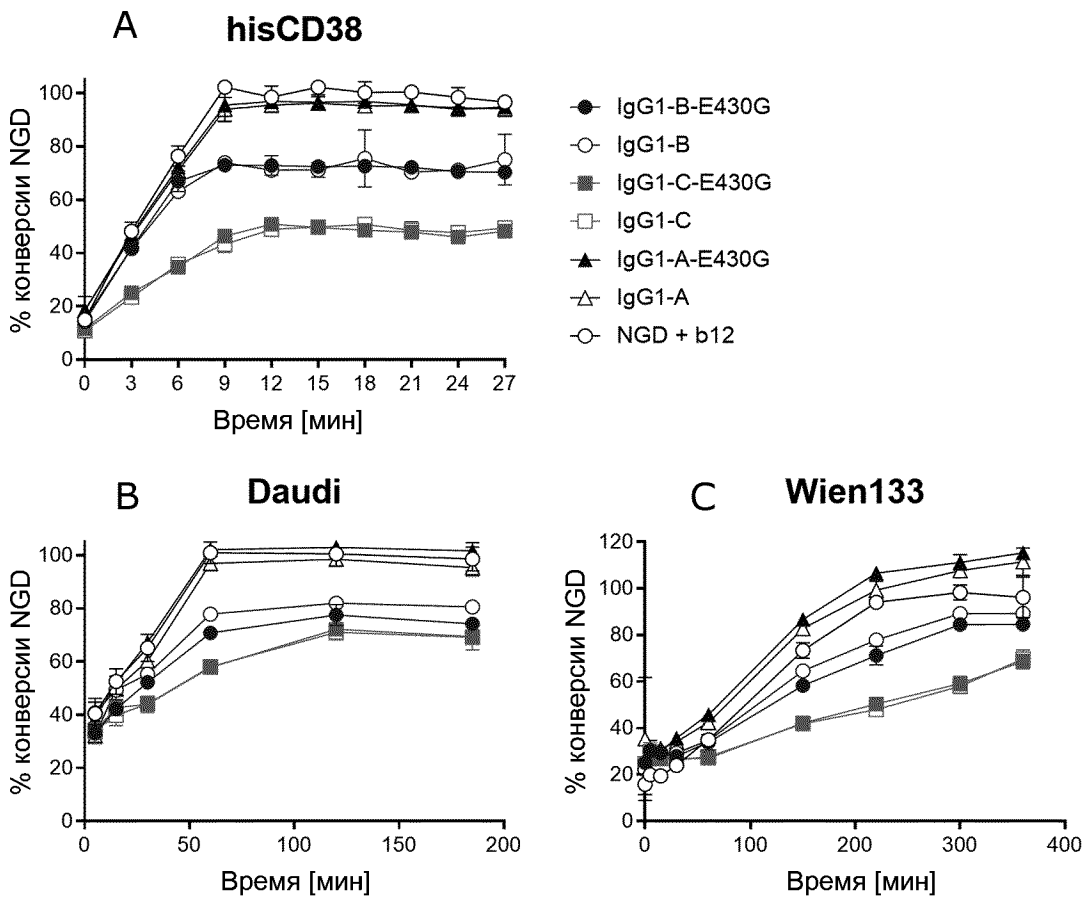
Фиг. 8



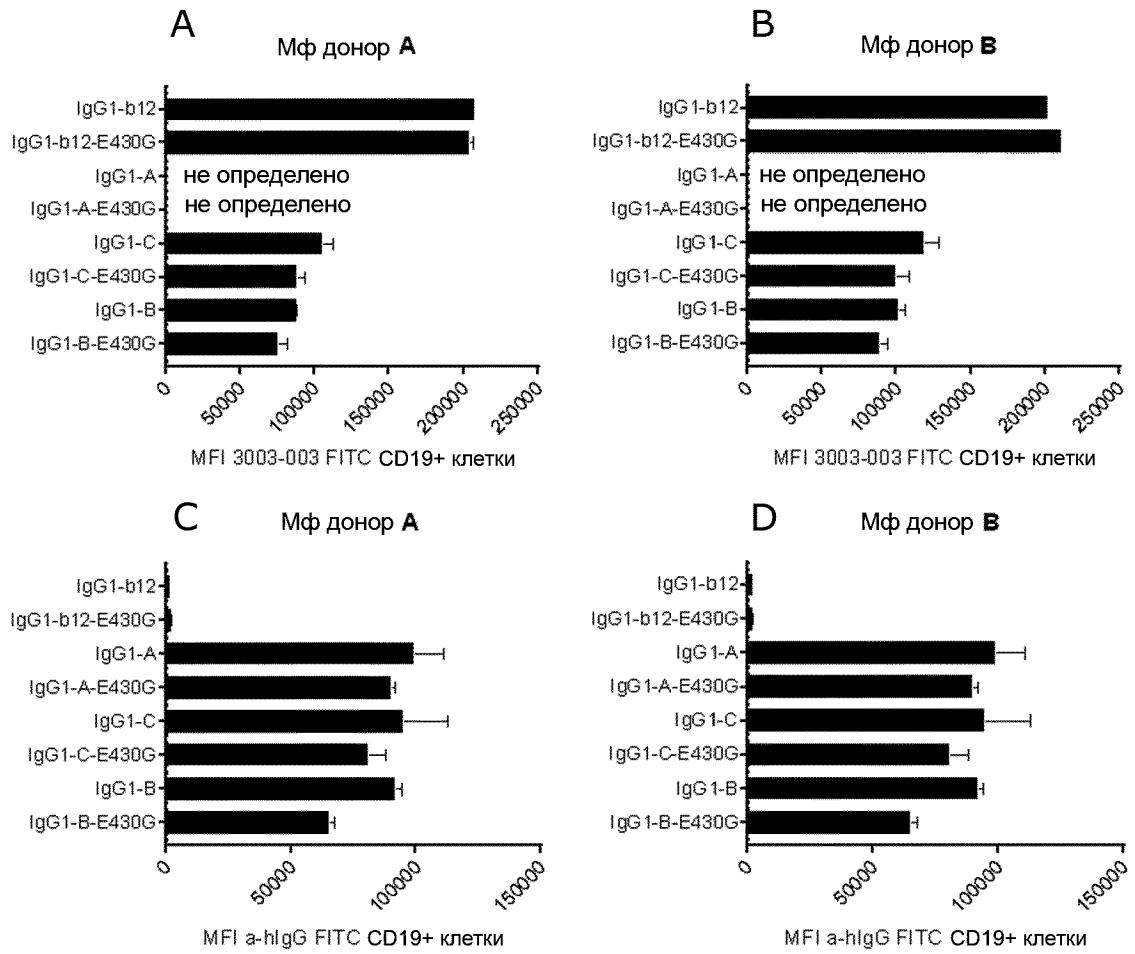
Фиг. 9



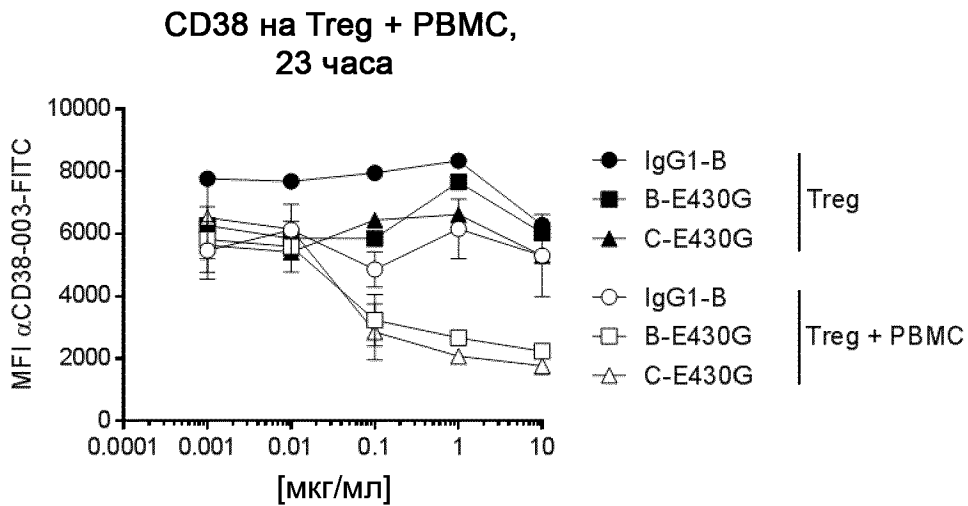
Фиг. 10



Фиг. 11

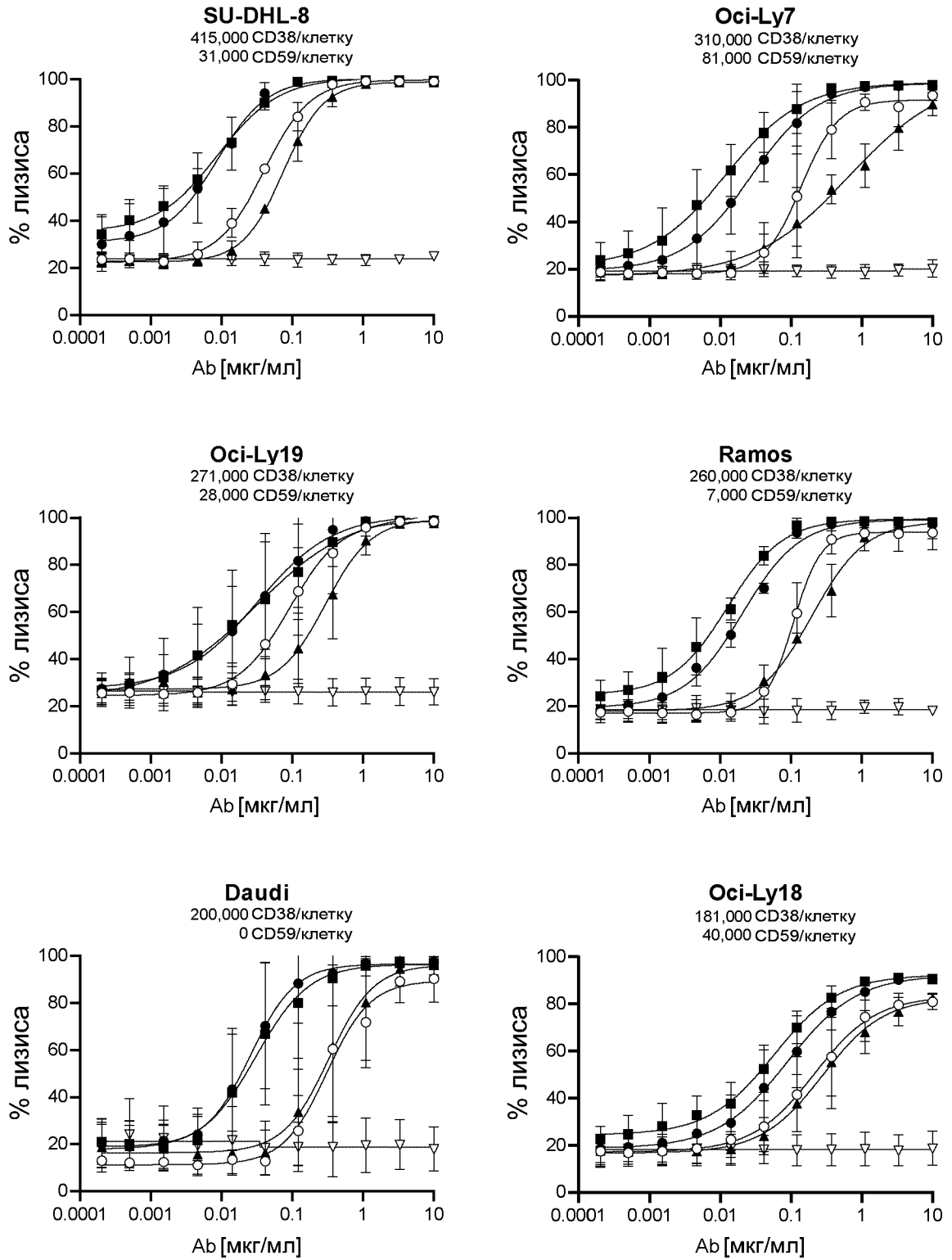


Фиг. 13

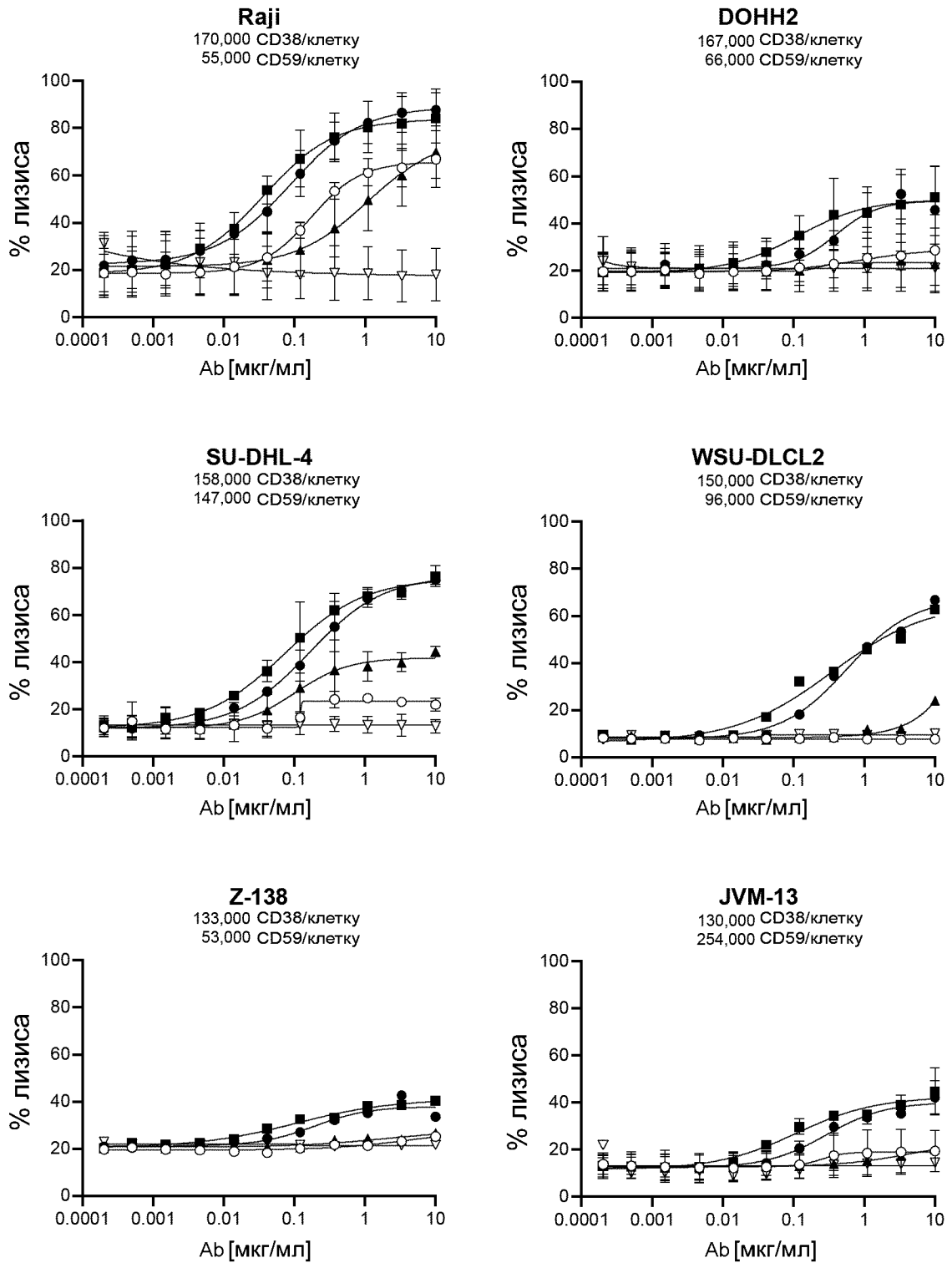


Фиг. 14

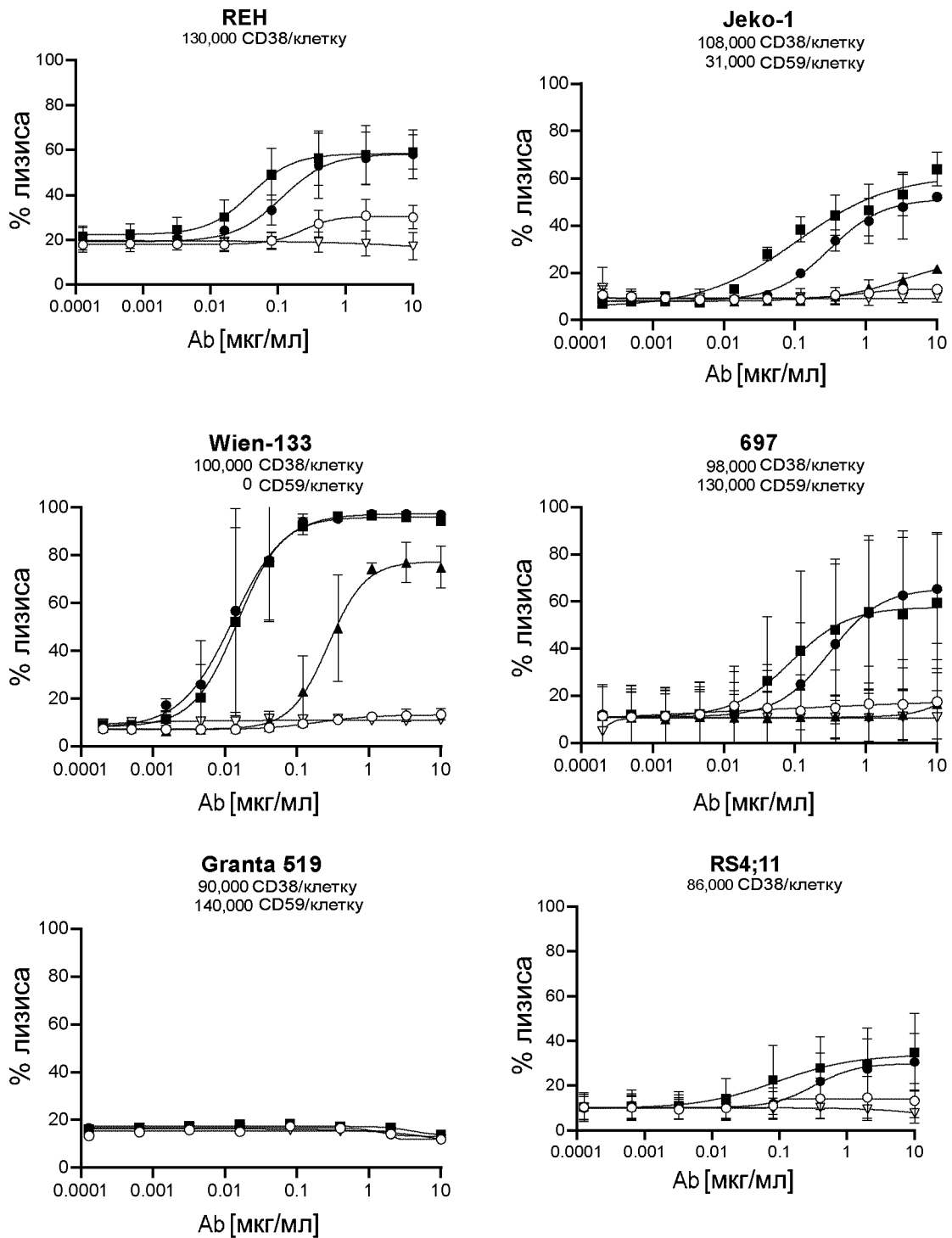




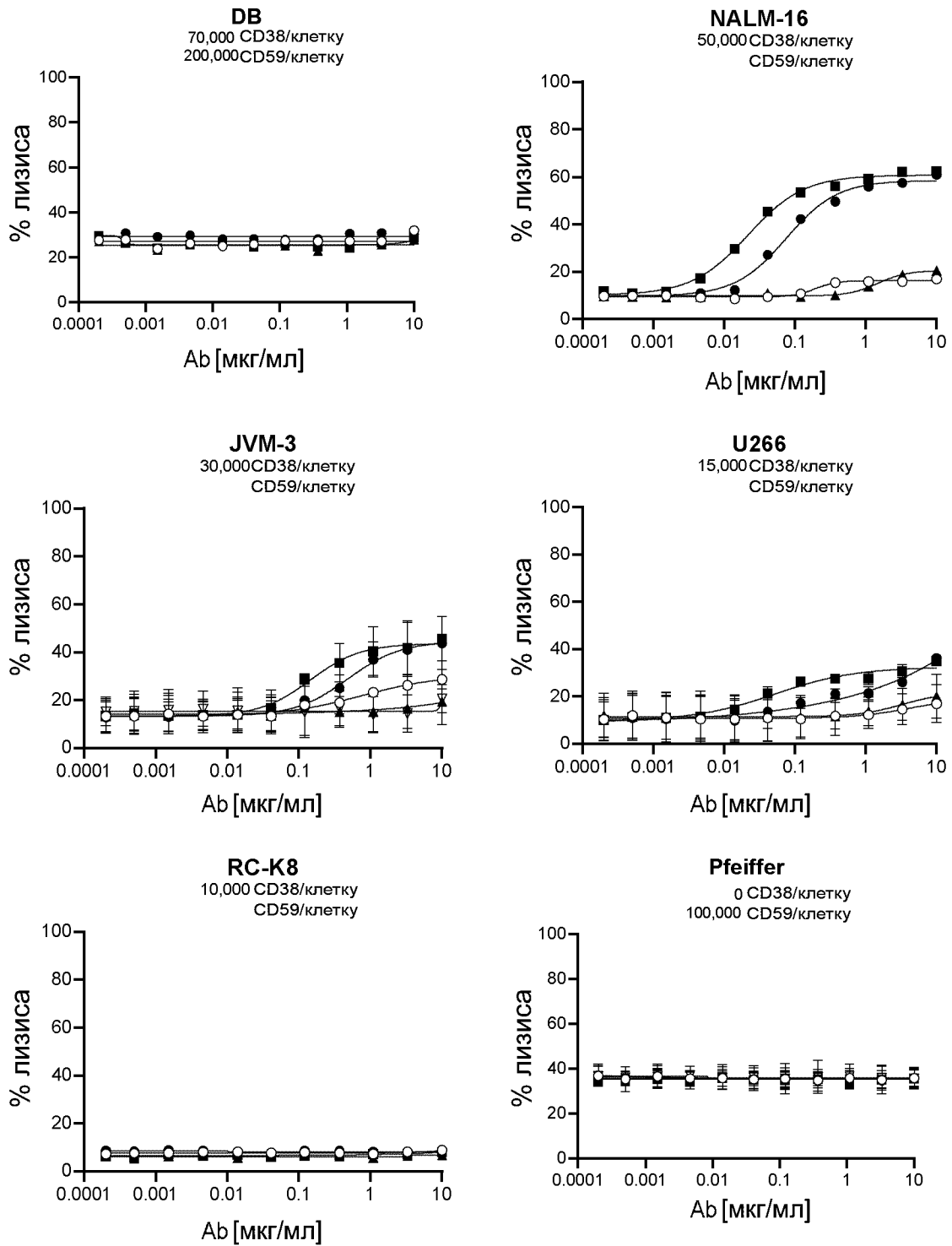
Фиг. 14



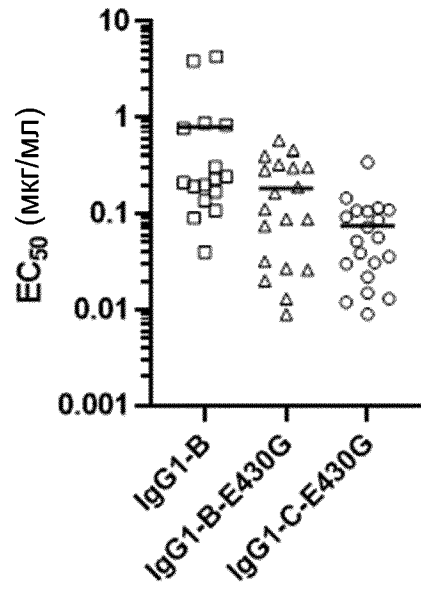
Фиг. 14 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



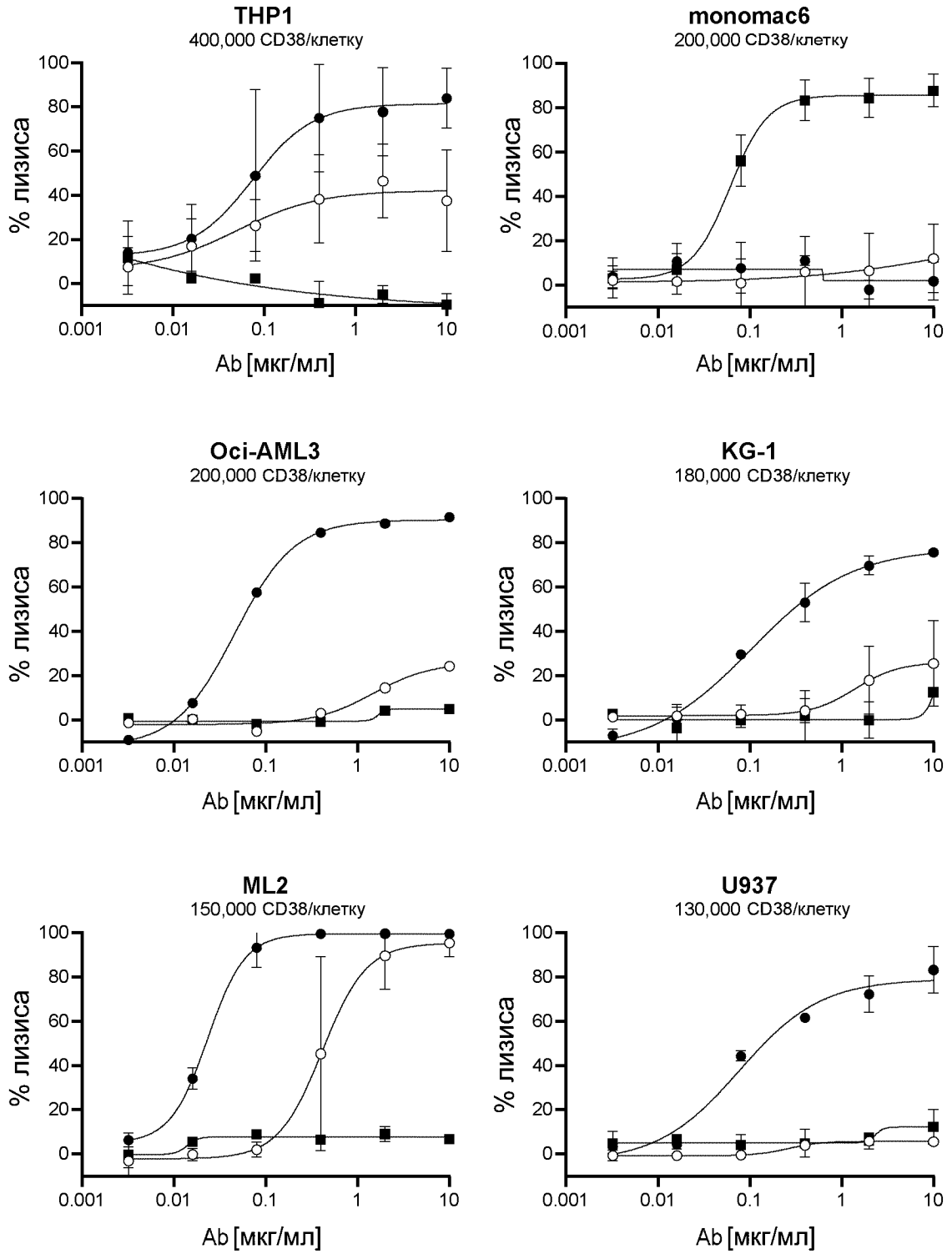
Фиг. 14 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



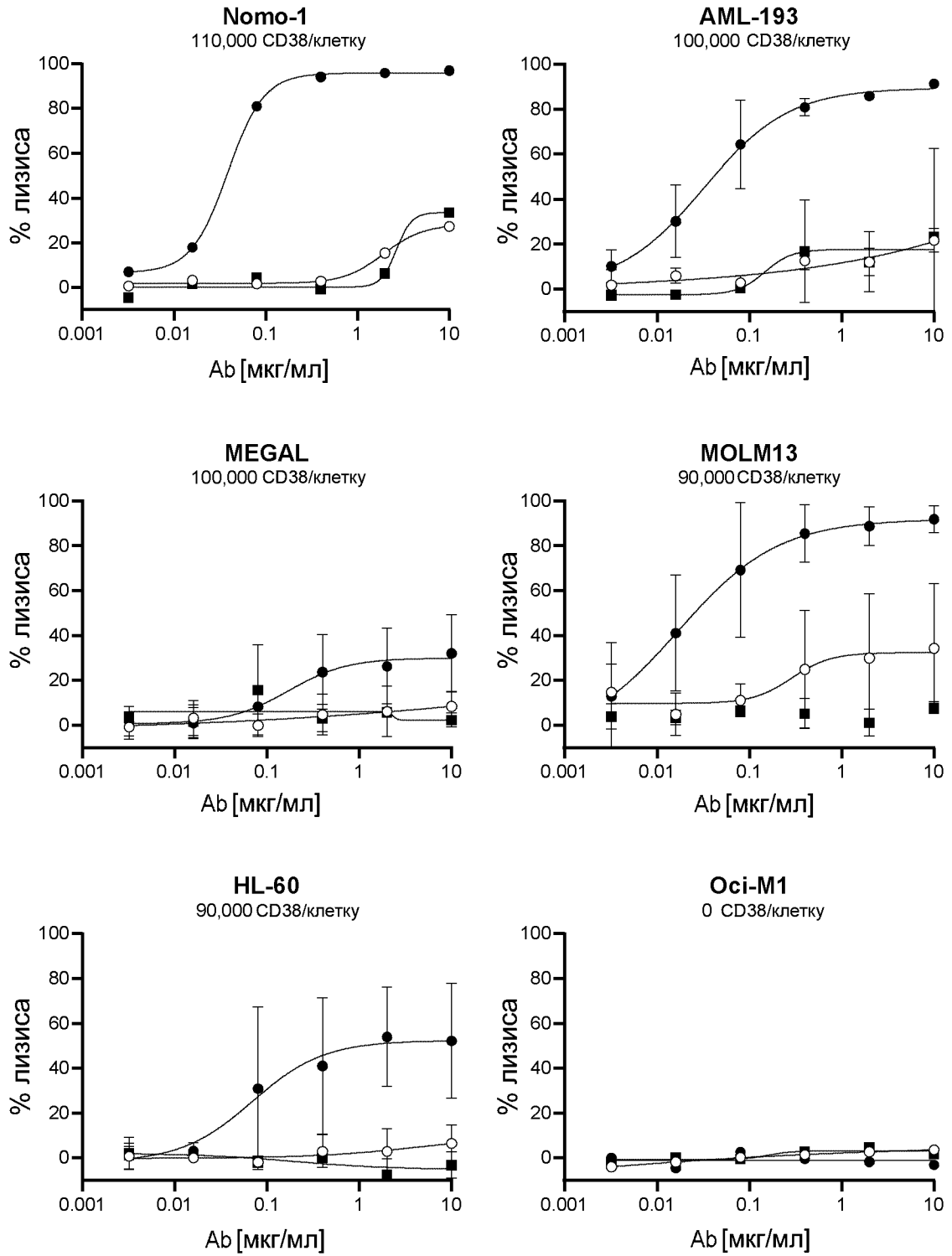
ФИГ. 14 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



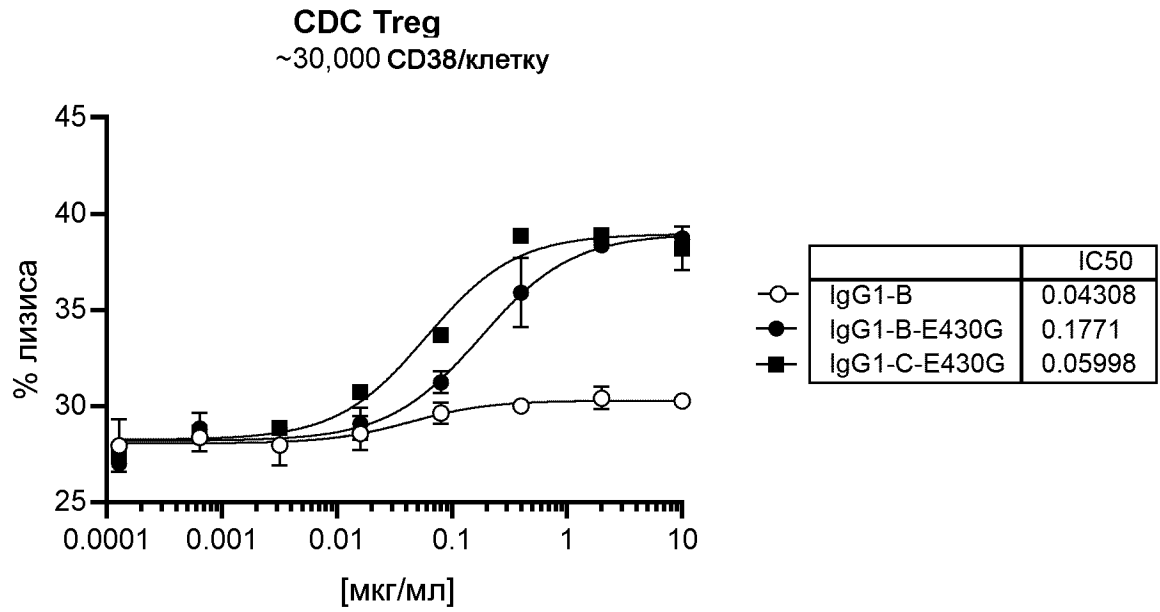
Фиг. 15



Фиг. 16



ФИГ. 16 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

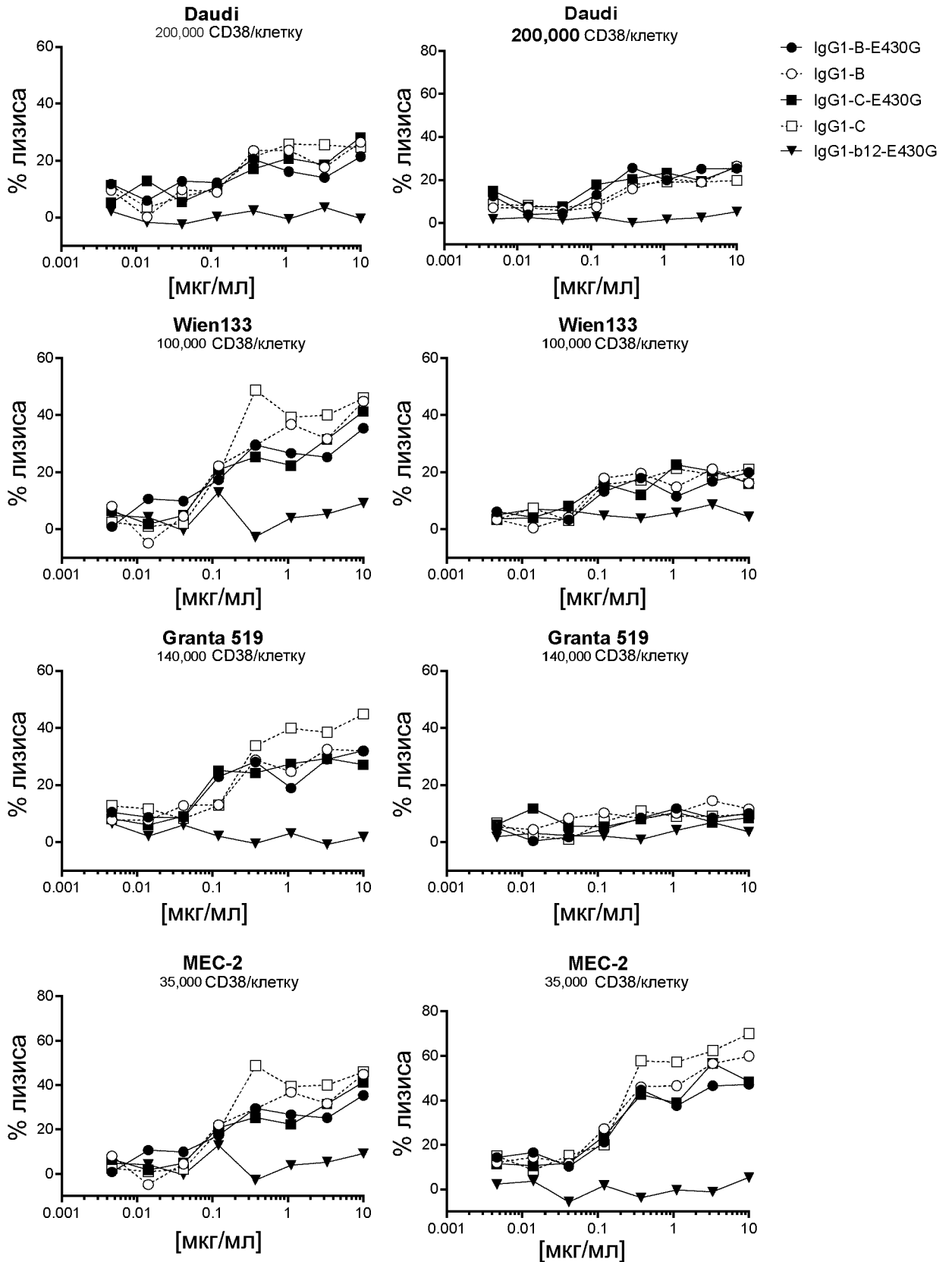


Фиг 17

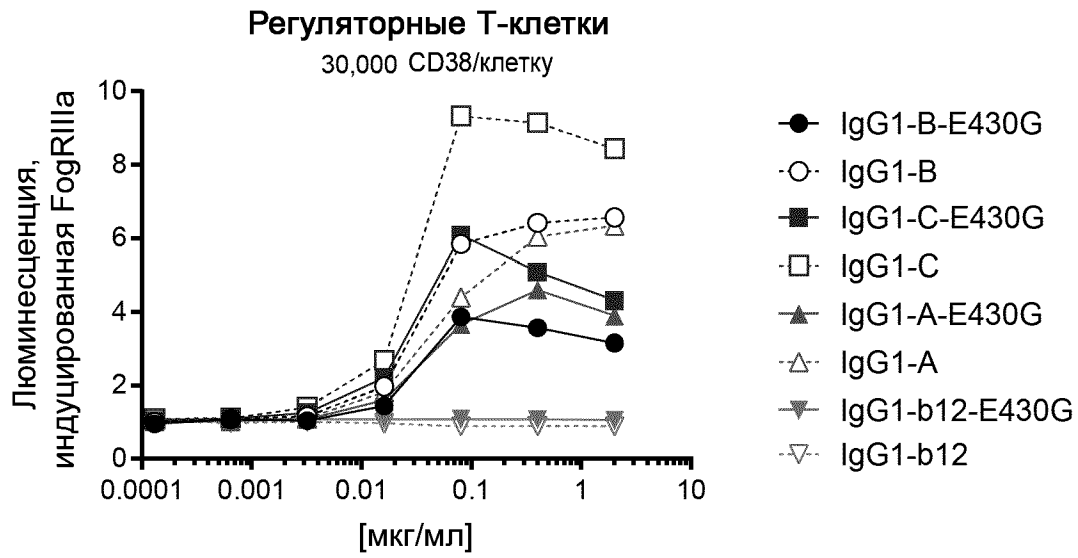


Донор В

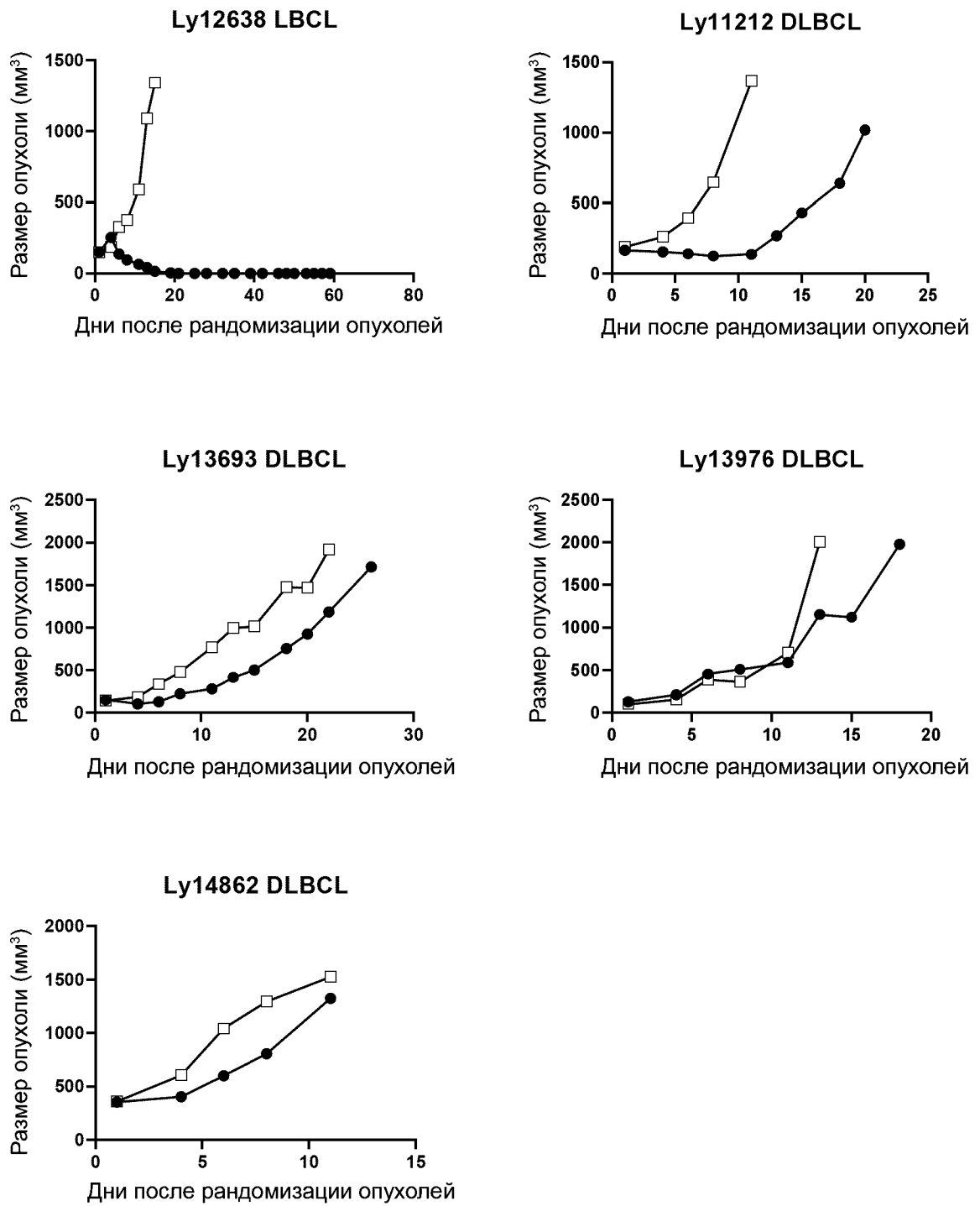
Донор С



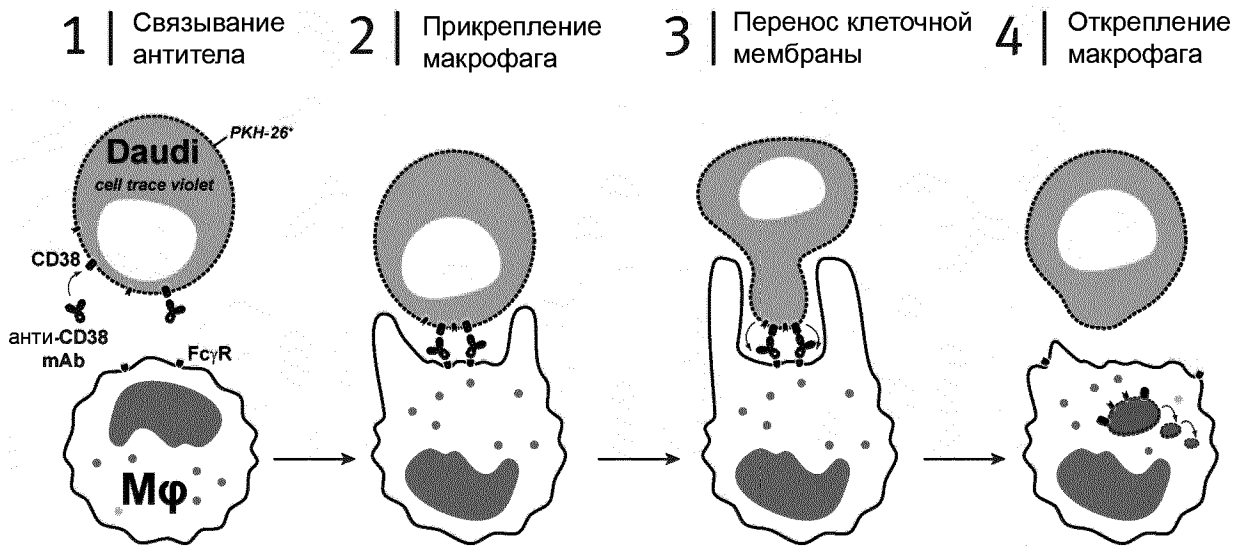
Фиг. 18



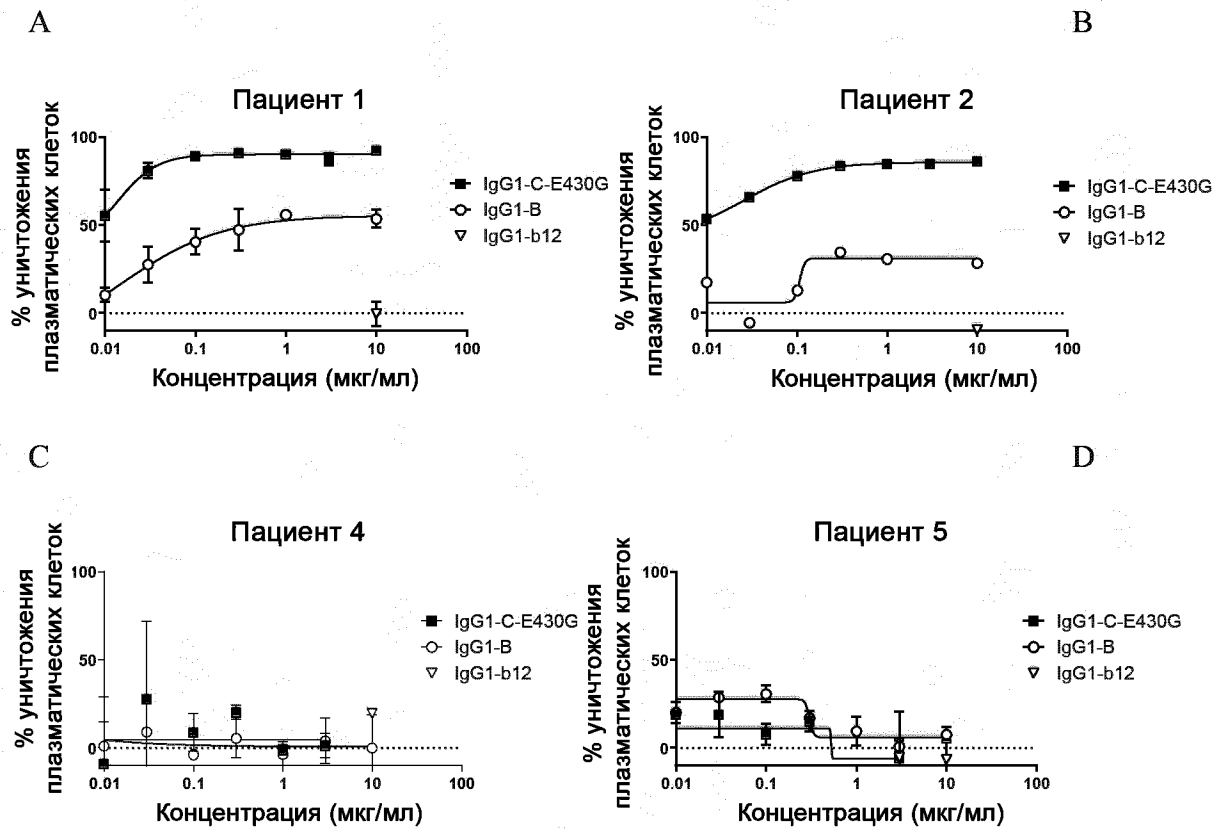
Фиг. 19



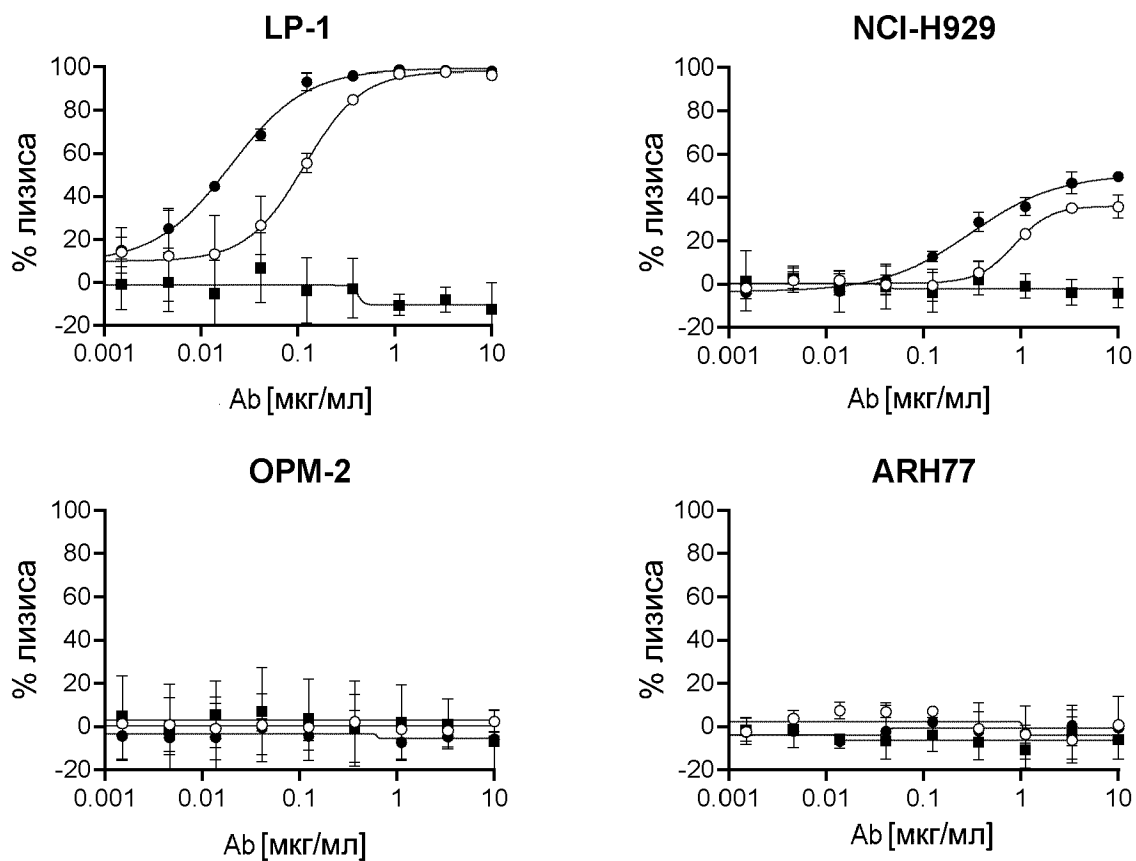
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23