

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048267**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.13**

**(21)** Номер заявки  
**202290568**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.05.20**

**(51)** Int. Cl. **A61P 37/06** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА К CD38 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДОЗА ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ И ПРОЧИХ CD38-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

---

**(31)** 62/164,206; 62/214,586

**(32)** 2015.05.20; 2015.09.04

**(33)** US

**(43)** 2022.12.30

**(62)** 201792546; 2016.05.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК.; ТАФТС  
МЕДИКАЛ СЕНТЕР, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Доши Парул, Сассер Эми, Чаулагин  
Чакра, Комензо Рэймонд, Ма Сюнь  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Кузнецова  
Е.В., Кузнецова Т.В. (RU)**

**(56)** US-A1-20150118251

Chaulagain et al. How We Treat Systemic Light-Chain Amyloidosis. Clinical Advances in Hematology & Oncology (9 May 2015), Vol 13, no 5, pp 315-327, abstract, pg 319, col 1, para 2, col 2 para 4, pg 320, col 1 para 1, para 3, col 2, para 1, para 5, pg 321, col 1 para 1-2, para 3, pg 322, col 2, para 3

Chaulagain et al. How We Treat Systemic Light-Chain Amyloidosis. Clinical Advances in Hematology & Oncology (9 May 2015), Vol 13, no 5, pp 315-327, abstract, pg 319, col 1, para 2, col 2 para 4, pg 320, col 1 para 1, para 3, col 2, para 1, para 5, pg 321, col 1 para 1-2, para 3, pg 322, col 2, para 3 (Note: This reference is used to show the date of the "Chaulagain et al. How We Treat Systemic Light-Chain Amyloidosis" reference is such as the article was listed and available on 09.05.2015)

EP-A1-2561868

US-A1-20140155584

US-A1-20110066111

US-A1-20110099647

US-A1-20140248238

---

**(57)** Изобретение относится к вариантам комбинированной терапии антителами к CD38 и полностью транс-ретиноевой кислотой.

---

**B1**

**048267**

**048267 B1**

### Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения амилоидоза легких цепей и прочих CD38-положительных гематологических злокачественных опухолей.

### Предпосылки создания изобретения

Злокачественные В-клеточные опухоли включают хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, мантийноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, лимфому Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, первичную выпотную лимфому и СПИД-ассоциированную неходжкинскую лимфому. На долю злокачественных В-клеточных опухолей приходится более 85% диагностированных лимфом.

Множественная миелома (ММ) характеризуется латентным накоплением секреторных плазмочитов в костном мозге с низким пролиферативным индексом и увеличенным жизненным циклом. Заболевание в конечном счете поражает кости и костный мозг, что приводит к появлению множественных опухолей и поражений во всей скелетной системе. Приблизительно 1% всех видов рака и немного более 10% всех гематологических злокачественных опухолей могут быть отнесены к множественным миеломам. Вероятность появления множественной миеломы повышается у людей старшего возраста, при этом средний возраст на момент диагностирования составляет около 61 года.

Амилоидоз легких цепей (АЛЦ) (также называемый системным амилоидозом) представляет собой нарушение функции клональных плазмочитов, при котором фрагменты неправильно сложенных легких цепей иммуноглобулина откладываются в тканях. Моноклональные плазмочиты в костном мозге продуцируют неправильно сложенные легкие цепи иммуноглобулинов, которые накапливаются в тканях и вызывают токсичность в жизненно важных органах, приводящую к отказу органа и смерти (Comenzo et al., *Leukemia* 26: 2317-25, 2012). Клинические проявления зависят от затронутых органов;

амилоидоз часто проявляется в почках, в сердце, на коже, в нервной системе и в мягких тканях, таких как язык (Merlini and Belotti, *NEJM*, 349: 583-596, 2003), приводя к альбуминурии и почечной недостаточности, сердечной недостаточности, аритмии, риску внезапной сердечной смерти, гепатомегалии, вздутию живота, преждевременному насыщению, парестезиям, дизестезиям,

ортостатической гипотензии, запору или диарее (Chaulagain and Comenzo; *Curr Hematol Malig Rep* 8: 291-8, 2013).

CD38 представляет собой мембранный белок типа II, функцией которого является опосредованная рецепторами адгезия и сигнализация, а также опосредование мобилизации кальция посредством эктоферментативной активности, катализ образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из НАД<sup>+</sup>, а также гидролиз цАДФР в АДФ-рибозу (АДФР). CD38 опосредует секрецию цитокинов, а также активацию и пролиферацию лимфоцитов (Funaro et al., *J Immunol* 145:2390-6, 1990; Guse et al., *Nature* 398:70-3, 1999) и посредством своей НАД-гликогидролазной активности регулирует уровни внеклеточного НАД<sup>+</sup>, который задействован в модуляции компартмента регуляторных Т-клеток (Adriouch et al., 14:1284-92, 2012; Chiarugi et al., *Nature Reviews* 12:741-52, 2012).

CD38 экспрессируется на злокачественных плазмочитах множественной миеломы и задействован в различных гематологических злокачественных опухолях.

Современные средства лечения амилоидоза легких цепей и множественной миеломы включают различные химиотерапевтические препараты с трансплантацией аутологичных стволовых клеток либо без нее. Тем не менее оба заболевания остаются преимущественно неизлечимыми. Таким образом, существует потребность в дополнительных терапевтических средствах для лечения множественной миеломы и амилоидоза легких цепей.

### Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациента с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента с амилоидозом легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента с амилоидозом легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

### Краткое описание рисунков

На фиг. 1 показана относительная экспрессия CD38, CD32B, IL6R, gp130 и CD16 в транскрипционных профилях CD138<sup>+</sup> клональных плазмочитов у пациентов с впервые диагностированным АЛЦ (n=16 пациентов с АЛЦ, GEO GSE24128). LnQLE: натуральный логарифм количественного уровня экспрессии.

На фиг. 2 показан процент (%) NK-клеток в мононуклеарных клетках в периферической крови пациентов с АЛЦ через 3 недели после трансплантации стволовых клеток (SCT).

На фиг. 3 показано, что CD38 экспрессирован в CD34<sup>+</sup> гемопоэтических клетках-предшественницах.

На фиг. 4А показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает влияния на пролиферацию неотобранных мобилизованных клеток-предшественниц крови, оттаявших после криоконсервации, которые оценивали по способности клеток-предшественниц к образованию сходного числа колоний в присутствии 500 нг/мл или 1000 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) в сравнении с изотипическим контролем. В этом анализе колониеобразующие единицы гранулоцитарно-макрофагального ряда (CFU-GM) оценивали через 14 дней культивирования в метилцеллюлозе в присутствии DARZALEX™ (даратумумаба), с изотипическим контролем или контролем отсутствия антител, и строили график % образованных колоний в зависимости от контроля отсутствия антител. \*  $p < 0,05$ ; парный t-критерий. Все анализы проводили в трех повторностях, и 3 независимых эксперимента были выполнены с использованием образцов клеток-предшественниц от 3 разных пациентов. Данные показывают среднее  $\pm$  CO.

На фиг. 4В показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает влияния на пролиферацию неотобранных мобилизованных клеток-предшественниц крови, оттаявших после криоконсервации, которые оценивали по способности клеток-предшественниц к образованию сходного числа колоний в присутствии 500 нг/мл или 1000 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) в сравнении с изотипическим контролем. В этом анализе бластообразующие единицы эритроидов (BFU-E) оценивали через 14 дней роста в метилцеллюлозе в присутствии DARZALEX™ (даратумумаба), с изотипическим контролем или контролем отсутствия антител, и строили график % образованных колоний в зависимости от контроля отсутствия антител. Все анализы проводили в трех повторностях, и 3 независимых эксперимента были выполнены с использованием образцов клеток-предшественниц от 3 разных пациентов. Данные показывают среднее  $\pm$  CO.

На фиг. 5А показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает влияния на пролиферацию свежих, неотобранных мобилизованных клеток-предшественниц крови, которые оценивали по их способности к образованию сходного числа колоний в метилцеллюлозе в присутствии 500 нг/мл или 1000 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) в сравнении с изотипическим контролем. Образование колоний измеряли на 14-й день как CFU-GM, и строили график % образованных колоний в зависимости от контроля отсутствия антител. Все анализы проводили в трех повторностях, и 3 независимых эксперимента были выполнены с использованием образцов клеток-предшественниц от 3 разных пациентов. Данные показывают среднее  $\pm$  CO.

На фиг. 5В показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает влияния на пролиферацию свежих, неотобранных мобилизованных клеток-предшественниц крови, которые оценивали по их способности к образованию сходного числа колоний в метилцеллюлозе в присутствии 500 нг/мл или 1000 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) в сравнении с изотипическим контролем. Образование колоний измеряли на 14-й день как BFU-E, и строили график % образованных колоний в зависимости от контроля отсутствия антител. Все анализы проводили в трех повторностях, и 3 независимых эксперимента были выполнены с использованием образцов клеток-предшественниц от 3 разных пациентов. Данные показывают среднее  $\pm$  CO.

На фиг. 6А показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не убивает гемопоэтические клетки-предшественницы, отобранные по CD34, путем CDC, несмотря на высокую экспрессию CD38 в этих клетках.

Клетки CD34<sup>+</sup> инкубировали 1 час в сыворотке с высоким комплементом и без антител (CTL), с 500 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) (Dara) либо с 500 нг/мл изотипического контроля (Iso), после чего клетки высевали на полутвердую среду.

Образование колоний измеряли на 14-й день как CFU-GM на 500 отобранных по CD34 клеток. Результаты получены от анализа в трех повторностях с клетками от 1 пациента с ММ и 2 пациентов с АЛЦ.

На фиг. 6В показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не убивает гемопоэтические клетки-предшественницы, отобранные по CD34, путем CDC, несмотря на высокую экспрессию CD38 в этих клетках.

Клетки CD34<sup>+</sup> инкубировали 1 час в сыворотке с высоким комплементом и без антител (CTL), с 500 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) (Dara) либо с 500 нг/мл изотипического контроля (Iso), после чего клетки высевали на полутвердую среду.

Образование колоний измеряли на 14-й день как BFU-E на 500 отобранных по CD34 клеток. В планшетах с DARZALEX™ (даратумумабом) было больше BFU-E, достигших статистической значимости различия. Результаты получены от анализа в трех повторностях с клетками от 1 пациента с ММ и 2 пациентов с АЛЦ (\*  $p < 0,01$ ).

На фиг. 7А показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает вредного влияния на свежие клетки-предшественницы гранулоцитов-моноцитов, отобранные по CD34. Выделенные клетки CD34<sup>+</sup> инкубировали в среде, не содержащей антитела (CTL; контроль), DARZALEX™ (даратумумаб) (Dara) или изотипический контроль (Iso) - 500 нг/мл или 1000 нг/мл, как указано. Клетки помещали в метилцеллюлозу и измеряли образование колоний на 14-й день как CFU-GM на 500 клеток, отобранных по CD34. Результаты получены от анализа в трех повторностях с клетками от 1 пациента с ММ и 2 пациентов с

АЛЦ.

На фиг. 7В показано, что DARZALEX™ (даратумумаб) не оказывает вредного влияния на свежие клетки-предшественницы эритроидов, отобранные по CD34. Выделенные клетки CD34-инкубировали в среде, не содержащей антитела (CTL; контроль), даратумумаб или изотипический контроль (Iso) - 500 нг/мл или 1000 нг/мл. Клетки помещали в метилцеллюлозу и измеряли образование колоний на 14-й день как BFU-E на 500 клеток, отобранных по CD34. Результаты получены от анализа в трех повторностях с клетками от 2 пациентов с ММ и одного пациента с АЛЦ. \*p < 0,02.

На фиг. 8 показано, что полиморфизмы FCγRIIIa-158aa влияли на ADCC с опосредованием DARZALEX™ (даратумумабом). Пациенты с генотипами 158V/V (V/V) и 158F/V (F/V) демонстрировали повышенный уровень ответа по сравнению с пациентами с генотипом 158F/F (F/F) (вертикальная линия является медианной для каждой группы, P < 0,05, двусторонний критерий Манна-Уитни).

#### Подробное описание изобретения

Термин "CD38" относится к белку CD38 человека (синонимы: АДФ-рибозилциклаза 1, цАДФ-гидролаза 1, циклическая АДФ-рибозогидролаза 1). CD38 человека имеет аминокислотную последовательность, которая показана в GenBank в порядке поступления NP\_001766 и в SEQ ID NO: 1. Хорошо известно, что CD38 представляет собой однопроходный мембранный белок типа II с остатками аминокислот 1-21, представляющими цитозольный домен, остатками аминокислот 22-42, представляющими трансмембранный домен, и остатками 43-300, представляющими внеклеточный домен CD38.

SEQ ID NO: 1

```
MANCFEFPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLIILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTRKF
PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKIL
LWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLDLTLWCGEFNTSKINYQSCPDRKDCSNNPVSV
FWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKI FDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGRSDR
DLCQDPTIKELESIISKRNIIQFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI
```

Предполагается, что термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, включающие мышьиные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

Имуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "фрагменты антитела" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент F(ab)<sub>2</sub> - двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмент домена антитела (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-6, 1989), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций

одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкциями антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

Термин "выделенное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, по существу не содержащий других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с CD38, по существу, не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от CD38 человека). Однако изолированное антитело, специфически связывающееся с CD38, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как ортологи CD38 человека, например CD38 Macaca fascicularis (яванского макака). Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Переменная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязыва-

вающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: области, определяющие комплементарность (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat J Exp Med 132:211-50, 1970; Rabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). Термин "гипервариабельные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относится к областям вариабельных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987). Другие термины включают в себя "IMGT-CDR" (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) и "использование остатков, определяющих специфичность" (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www\\_imgt\\_org](http://www.imgt.org)) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

При использовании в настоящем документе термин "остатки по Chothia" означает остатки VL и VH антител с нумерацией по Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273:927-48, 1997).

Термины "каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой остаточные последовательности вариабельной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Так как антигенсвязывающие сайты, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркаса зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, в котором антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, а каркасы вариабельной области получены от последовательностей иммуноглобулинов человека. Гуманизованные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не являться точной копией экспрессированного иммуноглобулина человека или зародышевых генных последовательностей.

Термин "адаптированные для человека" антитела или "адаптированные для человеческого каркаса (HFA)" антитела относится к гуманизованным антителам, адаптированным по способам, описанным в патентной публикации США № US 2009/0118127. Адаптированные для человека антитела гуманизируют путем выбора человеческих каркасов-акцепторов на основе максимальных сходств CDR и FR, совместимости длин и сходств последовательностей петель CDR1 и CDR2 и части петель CDR3 легкой цепи.

Термин "антитело человека" относится к антителу, имеющему вариабельные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Антитело человека содержит вариабельные области тяжелой и/или легкой цепей, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, причем вариабельные области антитела получены из системы, в которой применяется иммуноглобулин человека зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулинов. Такие системы включают библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши или крысы, несущих локусы иммуноглобулинов человека, как описано в настоящем документе. Антитело человека может содержать аминокислотные отличия по сравнению с зародышевой линией человека или перестроенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, антитело человека по аминокислотной последовательности, по меньшей мере, на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии человека или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях антитело человека может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в публикации Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемые на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Выделенные гуманизованные антитела могут быть синтетическими. Антитела человека, хотя и полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включающий синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к получению антител, в естественных условиях не входящих в набор антител человека зародышевой линии *in vivo*.

Термин "рекомбинантное антитело" включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из организма животного (например, мыши или крысы), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или полученные из него гибридомы, антитела, выделенные из клетки-

хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* путем обмена плеч Fab, такие как биспецифические антитела.

Термин "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам. Следовательно, "моноклональным антителом" называется популяция антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как отрыв С-концевого лизина от тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование в пределах популяции антител. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, или одновалентным, бивалентным или мультивалентным.

Биспецифическое антитело включено в термин "моноклональное антитело".

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и они могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена находятся в непосредственной близости друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от контрольного полипептида или контрольного полинуклеотида одной или более модификациями, например, заменами, вставками или делециями.

Выражение "в комбинации с" означает, что два или более терапевтических средства вместе можно вводить субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, целью которого является замедление течения (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания или же достижение благоприятного или желаемого клинического результата в ходе лечения. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. К требующим лечения относятся субъекты, у которых уже отмечаются нежелательные физиологические изменения или заболевание, а также субъекты, склонные к физиологическим изменениям или заболеванию.

Выражение "ингибирует рост" (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) относится к измеримому снижению роста клеток *in vitro* или *in vivo* при приведении клеток в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических или лекарственных средств по сравнению с ростом тех же клеток, растущих в соответствующих контрольных условиях, хорошо известных специалистам в данной области. Ингибирование роста клетки *in vitro* или *in vivo* может составлять, по меньшей мере, около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Ингибирование роста клеток может происходить в соответствии с разнообразными механизмами, например, посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза, некроза или ингибирования пролиферации клеток.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного количества терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшение самочувствия пациента, сокращение опухолевой нагрузки, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Термин "пациент" включает в себя любых людей или животных. Термин "животное" включает в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т.д. Термины "пациент" и "субъект" в на-

стоящем документе применяются взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациентов с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с антителом к CD38, которое не убивает (напр., не опосредует уничтожение) гемопоэтические стволовые клетки CD34<sup>+</sup> внутри трансплантата, клетки которого также положительны по CD38. Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациентов с амилоидозом легких цепей. Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что антитело к CD38, DARZALEX™ (даратумумаб), эффективно в уничтожении плазмочитов АЛЦ, но не убивает гемопоэтические стволовые клетки CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>, выделенные из пациентов с амилоидозом легких цепей или множественной миеломой, что позволяет проводить комбинированное лечение с введением DARZALEX™ (даратумумаба) и трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Способы в соответствии с изобретением можно применять для лечения пациента-животного в рамках любой классификации. К примерам таких животных относятся млекопитающие, такие как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациента с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

Термин "CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль" относится к гематологической злокачественной опухоли, которая характеризуется наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, включая лейкозы, лимфомы, миелому и нарушение функции плазмочитов. Примеры CD38-положительных гематологических злокачественных опухолей включают в себя В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфому и В-клеточную неходжкинскую лимфому, острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и новообразования из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому (МКЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), включая высокодифференцированную, умеренно дифференцированную и низкодифференцированную ФЛ, накожную лимфому из клеток центра фолликула, В-клеточную лимфому маргинальной зоны (типа MALT, узлового и селезеночного типа), лейкоз ворсистых клеток, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (ЛБ), плазмочитому, множественную миелому (ММ), плазмочитарный лейкоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемию Вальденстрема, плазмочитарные лейкозы, анапластическую крупноклеточную лимфому (АККЛ) и амилоидоз легкой цеп (ААЛЦ).

Термин "нарушение функции плазмочитов", как понимается в настоящем документе, означает расстройства, которые характеризуются клональными плазмочитами, и включают в себя множественную миелому, амилоидоз легких цепей и макроглобулинемию Вальденстрема. Амилоидоз легких цепей и макроглобулинемию Вальденстрема возникают независимо от множественной миеломы. Они также могут проявляться одновременно со множественной миеломой, и развиваться либо перед, либо после развития множественной миеломы.

Таким образом, определения "CD38-положительной гематологической злокачественной опухоли" и "нарушения функции плазмочитов" могут частично перекрываться.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой амилоидоз легких цепей (АЛЦ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (ММ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому (ФЛ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому Беркитта (ЛБ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой нарушение функции плазмочитов.

В некоторых вариантах осуществления CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой амилоидоз легких цепей (АЛЦ), множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ).

Примеры В-клеточных неходжкинских лимфом представляют собой лимфогранулематоз, первичную выпотную лимфому, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, средостенную В-крупноклеточную лимфому, заболевания тяжелых цепей (включая  $\gamma$ -,  $\mu$ - и  $\alpha$ -цепи), лимфомы, индуцированные терапией иммуносупрессорными средствами, такие как лимфома, вызванная циклоспорином, и лимфома, вызванная метатрексатом.

В некоторых вариантах осуществления нарушение функции клеток, экспрессирующих CD38, представляет собой лимфому Ходжкина.

Другие примеры расстройств, связанных с CD38-экспрессирующими клетками, включают в себя злокачественные заболевания из Т- и НК-клеток, включая новообразования из зрелых Т-клеток и НК-клеток, включая Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, агрессивный лейкоз НК-клеток, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, экстранодальную НК-/Т-клеточную лимфому назального типа, 78 энтеропатийную Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, подкожную панникулит-подобную Т-клеточную лимфому, бластную НК-клеточную лимфому, фунгоидную гранулему/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные Т-клеточные лимфопролиферативные расстройства (первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома К-АККЛ, лимфоматоидный папулез, пограничные очаги), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, неспецифическую Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому.

Примеры злокачественных заболеваний, связанных с миелоидными клетками, включают в себя острый миелоидный лейкоз, включая острый промиелоцитарный лейкоз, и хронические миелопролиферативные заболевания, включая хронический миелоидный лейкоз.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента с амилоидозом легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента с амилоидозом легких цепей, включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения амилоидоза легких цепей, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента со множественной миеломой, включающий введение антитела к CD38 требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения множественной миеломы, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 конкурирует за связывание с CD38 с антигеном, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 связывается по меньшей мере с областью SKRNIQFSCKNLYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 4, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

Эпитоп антитела включает в себя некоторые или все из остатков, имеющих последовательности,

показанные в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере одну аминокислоту в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одну аминокислоту в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере две аминокислоты в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере две аминокислоты в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела содержит по меньшей мере три аминокислоты в области SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере три аминокислоты в области EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

Примером антитела, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1) является DARZALEX™ (даратумумаб).

Примером антитела к CD38, которое применимо в способах настоящего изобретения, является DARZALEX™ (даратумумаб). DARZALEX™ (даратумумаб) содержит аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL), приведенные в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно, CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, имеет подтип IgG1/κ и описан в патенте США № 7,829,693. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи DARZALEX™ (даратумумаба) показана в SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 13.

Антитела можно оценивать по их конкуренции с контрольным антителом, например DARZALEX™ (DARZALEX™ (даратумумаб)), имеющий VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, для связывания с CD38 с применением хорошо известных способов *in vitro*. В примере способа клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие CD38, могут инкубироваться с немеченым контрольным антителом в течение 15 мин при 4°C с последующим инкубированием с избытком флуоресцентно меченного исследуемого антитела в течение 45 мин при 4°C. После промывания в фосфатно-солевом буферном растворе с бычьим сывороточным альбумином (PBS/BSA) можно проводить измерение флуоресценции проточной цитометрией с помощью стандартных способов. В другом примере способа внеклеточный домен CD38 может быть нанесен на поверхность планшета для ELISA. В течение около 15 минут можно добавлять избыток немеченого контрольного антитела, а впоследствии можно добавлять биотинилированные исследуемые антитела. После промывок в PBS/Tween можно выявлять связывание исследуемого биотинилированного антитела с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и обнаруживать сигнал с помощью стандартных способов. Очевидно, что в конкурентных анализах контрольное антитело может быть меченым, а исследуемое антитело - немеченым. Исследуемое антитело конкурирует с контрольным антителом, если контрольное антитело ингибирует связывание исследуемого антитела, или исследуемое антитело ингибирует связывание контрольного антитела с CD38 по меньшей мере на 80%, например, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Можно дополнительно определить эпитоп исследуемого антитела, например, путем пептидного картирования или посредством анализов с защитой водорода/дейтерия с помощью известных способов, или же посредством определения структуры кристалла.

Антитела, связывающиеся с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 2 и 3, с помощью стандартных способов и как описано в настоящем документе ниже и характеристики полученных антител по связыванию с пептидами, например, используя анализ ELISA или исследование мутагенеза.

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNIYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA  
ISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK  
ILWFGPEVFDYWGQGLTIVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  
ASNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ  
GTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGPEVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGPEVFDYWGQGLTIVTVSSA  
STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFVAVLQSSGLYSL  
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP  
ARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYE  
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Другими примерами антител к CD38, которые применимы в способах настоящего изобретения, являются:

mAb003, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 14 и 15 соответственно и описанное в патенте США № 7,829,693. VH и VL mAb003 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIAN  
SAQKFQGRVTTITADKSTSTAY

MDLSSLRSEDVAVYYCARDIAALGPFQDYWGQGLTLTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQF

EDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK;

mAb024, содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, описанное в патенте США № 7,829,693. VH и VL mAb024 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPHDSDAR  
YSPSFQGVTFADKSIKSTAY

LQWSSLKASDTAMYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVSS

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP  
ARFSGSGSGTDFTLTISLQF

EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK;

MOR-202 (MOR-03087), содержащее последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно, описанное в патенте США № 8,088,896. VH и VL MOR-202 могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLY

LQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAWYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYVYQQKPGQAPVLIYGDVSKRPSGIPE  
RFSGSNSGNTATLTISGTQAE

DEADYYCQTYTGGASLVFVGGGTKLTVLGQ;

Изатуксимаб, содержащий последовательности VH и VL с SEQ ID NO: X и X соответственно, описанный в патенте США № 8,153,765. VH и VL изатуксимаба могут экспрессироваться в виде IgG1/κ.

SEQ ID NO: 20:

QVQLVQSGAEVAKPGTTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGT  
IYPGDGDTGYAQKFGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGD  
YYGSNSLDYWGQTSVTVSS

SEQ ID NO: 21:

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSIITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYS  
ASYRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGG  
GTKLEIK

Другие примеры антител к CD38, которые можно применять в способах изобретения, включают в себя антитела, описанные в международной патентной публикации № WO 05/103083, международной патентной публикации № WO06/125640, международной патентной публикации № WO 07/042309, международной патентной публикации № WOO8/047242 или международной патентной публикации № WO 14/178820.

В некоторых вариантах осуществления АЛЦ характеризуется сердечной стадией I, сердечной стадией II или сердечной стадией III.

В некоторых вариантах осуществления АЛЦ является рецидивирующим или рефрактерным.

АЛЦ диагностируется врачом согласно руководящим принципам, представленным, например, в Национальной всеобщей онкологической сети ([http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines\\_as\\_p#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines_as_p#site)). Нарушения у пациентов с АЛЦ проявляются в различных системах органов вследствие

накопления легких цепей и их неправильно сложенных промежуточных форм в виде амилоидных волокон в жизненно важных органах, что вызывает дисфункцию органов и смерть. На момент постановки диагноза пациенты могут иметь множество пораженных систем органов; около одной трети пациентов на момент постановки диагноза имеют более 3 пораженных органов (Chaulagain and Comenzo, *Curr Hematol Malig Rep* 8: 291-8, 2013). Чтобы спрогнозировать дальнейшее течение АЛЦ, необходимо установить сердечную стадию, поскольку сердечные нарушения, по-видимому, проявляются у всех пациентов с АЛЦ на момент постановки диагноза, даже если у пациента не наблюдаются симптомы (Palladini et al., *Blood* 116: 3426-30, 2010; Kristen et al., *Blood* 116:2455-61, 2010). На основании наличия одного, двух или обоих из сердечных биомаркеров: N-концевого прогормона натрийуретического пептида мозга (NT-proBNP) и тропонина Т, пациентов с АЛЦ можно классифицировать по сердечным стадиям I, II или III, см., напр., Comenzo et al., *Leukemia* 26: 2317-25, 2012.

Современный выбор вариантов лечения АЛЦ направлен на уничтожение плазмочитов, секретирующих легкие цепи иммуноглобулина, и включает в себя комбинацию таких агентов, как Velcade® (бортезомиб), циклофосфамиды, такие как Cytoxan® или Neosar®, Alkeran® (мелфалан), Thalomid® (талидомид), Revlimid® (леналидомид) или Pomalyst® (помалидомид), а также стероиды (дексаметазон), альфа-интерферон (IFN-α) и трансплантацию стволовых клеток. Высокие дозы Alkeran® (мелфалана) можно применять вместе с трансплантацией стволовых клеток (см., например, Anderson et al., *Systemic light chain amyloidosis, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Version 1. 2015, NCCN. org. 2 014*). Для лечения АЛЦ сейчас оценивают NINLARO® (иксазомиб), ингибитор протеасом. Для лечения АЛЦ сейчас оценивают NEOD001, моноклональное антитело, нацеленное на амилоидный белок АЛЦ.

В некоторых вариантах осуществления ММ является рецидивирующим или рефрактерным.

Доступные на данный момент варианты лечения ММ включают в себя химиотерапию, трансплантацию стволовых клеток, Thalomid® (талидомид), Revlimid® (леналидомид), Velcade® (бортезомиб), Kyprolis® (карфилзомиб), Farydak® (панобиностат), Aredia® (памидронат) и Zometa® (золедроновую кислоту). Современные протоколы лечения, которые включают комбинацию таких химиотерапевтических препаратов, как Oncovin® (винкристин), BiCNU® (BCNU, кармустин), Alkeran® (мелфалан), циклофосфамид, Adriamycin® (доксорубицин) и преднизон или дексаметазон, обеспечивают уровень полной ремиссии, составляющий только около 5%, а медианное время выживания с момента постановки диагноза составляет приблизительно 36-48 месяцев. Дополнительно достигнуты положительные результаты исследования агента иксазомиба в основном клиническом испытании на пациентах с рецидивирующей множественной миеломой. Последние достижения с применением высоких доз химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных клеток костного мозга или мононуклеарных клеток периферической крови повысили уровень полной ремиссии и длительность ремиссии, однако общая выживаемость была повышена не намного, и не было получено сведений об излечении. В конечном итоге у всех пациентов с ММ наблюдался рецидив даже в случае применения поддерживающей терапии интерфероном-альфа (IFN-α), как одним, так и в комбинации со стероидами.

Различные качественные и/или количественные способы можно применять для определения рецидивирующих или рефрактерных форм заболевания. Симптомами, которые могут быть связаны с рецидивом или резистентностью заболевания, являются, например, ухудшение или отсутствие улучшения состояния пациента или возврат или ухудшение различных симптомов гематологической злокачественной опухоли, и/или распространение раковых клеток в организме из одной локации в другие органы, ткани или клетки. Симптомы, связанные с гематологической злокачественной опухолью, могут варьировать в зависимости от типа ракового заболевания. Например, связанные с АЛЦ симптомы могут включать в себя повышенную утомляемость, пурпуру, увеличение языка, диарею или отек, протеинурию или повышение уровня свободных легких цепей в плазме.

В некоторых вариантах осуществления HSCT является аллогенной, аутологичной или сингенной, т.е. от донора-близнеца. Аутологичная HSCT включает извлечение HSC у субъекта и замораживание полученных HSC. После миелоабляции хранимые HSC субъекта обратно трансплантируют субъекту. При аллогенной HSCT используют HSC, полученные у аллогенного донора HSC, у которого тип HLA совпадает с субъектом.

В настоящем документе термин "трансплантация гемопоэтических стволовых клеток" означает трансплантацию стволовых клеток крови, полученных из костного мозга (в данном случае известную как трансплантация костного мозга), крови (например, периферической крови и крови пуповины) или амниотической жидкости.

В настоящем документе термин "трансплантация гемопоэтических стволовых клеток" означает, что пациенту уже проведена, проводится или будет проводиться HSCT.

В некоторых вариантах осуществления перед HSCT пациенту была проведена химиотерапия и/или радиационная терапия.

Пациенты могут получать курс химиотерапии и/или радиационной терапии перед проведением HSCT (так называемая подготовка к трансплантации) для уничтожения некоторых или всех гемопоэтических клеток пациента перед трансплантацией. В случае аллогенной HSCT пациента могут также ле-

чить иммунодепрессантами. Примером подготовительной терапии перед трансплантацией является использование высоких доз мелфалана (см., например, Skinner et al., *Ann Intern Med* 140:85-93, 2004; Gertz et al., *Bone Marrow Transplant* 34:1025-31, 2004; Perfetti et al., *Haematologica* 91:1635-43, 2006). Радиационная терапия, которая может быть использована для лечения перед трансплантацией, может проводиться в соответствии с общеизвестными протоколами для данной области. Радиационная терапия может также проводиться одновременно, последовательно или отдельно от терапии антителом к CD38.

DARZALEX™ (даратумумаб) может не опосредовать уничтожение стволовых клеток CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> внутри трансплантата и,

следовательно, является приемлемым терапевтическим средством в комбинации с HSCT. Антитела, которые конкурируют с даратумумабом, и/или антитела, которые связывают тот же эпитоп, что и DARZALEX™ (даратумумаб), тоже могут не уничтожать стволовые клетки CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>.

Другие примеры антител, которые могут быть применимы в способах описанного в настоящем документе изобретения, могут не уничтожать стволовые клетки CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> внутри трансплантата и, следовательно, являются приемлемыми терапевтическими средствами в комбинации с HSCT. Неспособность этих антител к уничтожению стволовых клеток CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> внутри трансплантата оценивают с помощью способов, описанных в настоящем документе.

Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут также быть выбраны *de novo* из, например, библиотеки фагового дисплея, где фаг конструируется таким образом, чтобы экспрессировать иммуноглобулины человека или их участки, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные вариабельные области антитела (Knappik et al., *J Mol Biol* 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Meth* 254:67-84, 2001; Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14:309-314, 1996; Sheets et al., *PITAS (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J Mol Biol* 227:381, 1991; Marks et al., *J Mol Biol* 222:581, 1991). Вариабельные домены, связывающие CD38, можно изолировать из, например, библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков, слитых с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в Shi et al., *J. Mol. Biol.* 397:385-96, 2010 и в международной патентной публикации № WO 09/085462). Можно проводить скрининг библиотек антител в отношении связывания с внеклеточным доменом CD38 человека, дополнительно характеризовать полученные положительные клоны, из лизатов клонов выделять Fab и впоследствии клонировать в виде полноразмерных антител. Такое применение способов фагового дисплея для выделения антител человека принято в данной области техники. См., например, патент США № 5,223,409; патент США № 5,403,484; а также патент США № 5,571,698, патент США № 5,427,908, патент США № 5,580,717, патент США № 5,969,108, патент США № 6,172,197, патент США № 5,885,793; патент США № 6,521,404; патент США № 6,544,731; патент США № 6,555,313; патент США № 6,582,915; и патент США № 6,593,081.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело к CD38 не опосредует уничтожение CD34-положительных гемопоэтических клеток-предшественниц путем комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

Выражение "не уничтожает" или "не опосредует уничтожение" означает неспособность антитела к CD38 индуцировать уничтожение клеток по сравнению с соответствующим контролем, таким как изотипический контроль. Антитело к CD38 "не уничтожает", если измеренное уничтожение клеток в присутствии DARZALEX™ (даратумумаба) статистически незначительно по сравнению с уничтожением клеток в присутствии изотипического контроля. Изотипический контроль является хорошо известным термином.

Уничтожение CD34-положительных гемопоэтических клеток-предшественниц путем CDC можно измерять на выделенных свежих или замороженных клетках CD34<sup>+</sup> путем инкубации клеток в 10% сыворотке с комплементом и 500 нг/мл антител к CD38 и последующего анализа степени образования колоний клеток, нанесенных на полутвердую среду согласно известным способам. Например, образование BFU-E и CFU-GM можно оценивать после 14 дней культивирования с помощью коммерческих реагентов, таких как MethoCult™ компании Stem Cell Technologies.

Участок Fc антитела может опосредовать эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Такая функция может быть опосредована связыванием эффекторного (-ых) домена (-ов) Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или связыванием эффекторного (-ых) домена (-ов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект (-ы), опосредованный (-ые) Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит (-ят) к ингибированию и/или истощению клеток-мишеней, например CD38-экспрессирующих клеток. Изотипы IgG человека IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 показывают различную способность к выполнению эффекторных функций. ADCC может быть опосредована IgG1 и IgG3, ADCP может быть опосредован IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а CDC может быть опосредована IgG1 и IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение плазмочитов,

экспрессирующих CD38, *in vitro* путем антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, *in vitro* путем ADCC, ADCP или CDC.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, *in vitro* путем ADCC.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, *in vitro* путем ADCP.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 индуцирует уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, *in vitro* путем CDC.

Термины "антителозависимая клеточная цитотоксичность", "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляют собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными киллерными клетками, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках.

Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Гибель покрытых антителами клеток-мишеней, таких как CD38-экспрессирующие клетки, происходит в результате активности эффекторных клеток через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз. Для оценки ADCC-активности антитела к CD38 это антитело можно добавлять к CD38-экспрессирующим клеткам в комбинации с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз по существу обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или естественных внутриклеточных белков). Примеры эффекторных клеток для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Примеры клеток-мишеней включают в себя клетки Дауди (ATCC® CCL-213™) или опухолевые клетки В-клеточного лейкоза или лимфомы, экспрессирующие CD38. В примере анализа клетки-мишени метят 20 мкКи <sup>51</sup>Сг в течение 2 часов и тщательно промывают. Концентрацию клеток-мишеней могут корректировать до 1×10<sup>6</sup> клеток/мл и в различных концентрациях добавляют антитела к CD38. Проведение анализа начинают посредством добавления клеток Дауди в соотношении эффекторная клетка: клетка-мишень, равном 40:1. После инкубирования в течение 3 ч при 37°C проведение анализа прекращают путем центрифугирования и на сцинтилляционном счетчике измеряют высвобождение <sup>51</sup>Сг из лизированных клеток. Процентное значение клеточной цитотоксичности можно рассчитывать как % максимального лизиса, который можно индуцировать путем добавления к клеткам-мишеням 3% хлорной кислоты. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать ADCC на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% по сравнению с контролем (лизис клеток, индуцированный 3% хлорной кислотой).

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз" (ADCP) относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. ADCP может оцениваться с помощью моноцитарных макрофагов в качестве эффекторных клеток и клеток Дауди (ATCC® CCL-213™) или опухолевых клеток В-клеточного лейкоза или лимфомы, экспрессирующих CD38, в качестве клеток-мишеней, сконструированных с целью экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) или другой меченой молекулы. Соотношение эффекторная клетка: клетка-мишень может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов, с антителом к CD38 или без него. После инкубации клетки можно отделить с помощью акутазы. Идентификацию макрофагов можно провести с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, и можно определить процентное значение фагоцитоза на основании % флуоресцирующего GFP в макрофагах CD11<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> с помощью стандартных способов. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать ADCP на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который в свою очередь активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует проявлению ADCC посредством связывания на лейкоцитах с рецепторами комплемента (например, CR3). CDC для клеток, экспрессирующих CD38, может измеряться, например, путем высевания клеток Дауди при 1×10<sup>5</sup> клеток/лунку (50 мкл/лунку) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA), добавления 50 мкл антител к CD38 в лунки до конечной концентрации в диапазоне 0-100 мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной сыворотки человека в лунки и инкубирования

реакционной смеси в течение 45 мин при 37 °С. Процентное количество (%) лизированных клеток может определяться как % окрашенных пропидий йодидом клеток при анализе FACS с помощью стандартных способов. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут индуцировать CDC на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах около по меньшей мере 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc $\gamma$ RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-40, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID: 20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-73, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену  $\alpha$  1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-8, 2004), или коэкспрессия  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и  $\alpha$ -маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-6, 2006; Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-61, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008). ADCC, вызываемая антителами к CD38, которые применяются в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует индексу EC), как описано в патенте США № 6,737,056. CDC, вызываемая антителами к CD38, которые применяются в способах изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления, может также усиливаться за счет некоторых замен в Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 423, 268, 267 и/или 113 (нумерация остатков в соответствии с индексом EC), как описано в Moore et al., *Mabs* 2:181-9, 2010.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит замещение в Fc антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит замену в Fc антитела в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 и/или 430 (нумерация остатков соответствует индексу EC).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит замещение в Fc антитела в положениях аминокислот 113, 267, 268 и/или 423 (нумерация остатков согласно индексу EC).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы от около 0 до около 15%, например, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы около 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%;

Замены в Fc и сниженное содержание фукозы могут усиливать активность ADCC антитела к CD38.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут быть охарактеризованы и количественно измерены посредством множества способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной публикации № WO2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением посредством ВЭЖХ (СВЭЖХ) с обнаружением с помощью флуоресценции и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой гликанов Asn297 или без нее с помощью Endo S или другого фермента, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, сохраняя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщеплением mAb на составляющие пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); или 5) отделением олигоса-

харидов mAb от белка mAb на Asn 297 посредством специфического ферментативного дегликозилирования с помощью PNGase F. Высвобожденные олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методиками, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определять степень сиалилирования ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделять и количественно измерять формы олигосахаридов по критерию гидрофильности посредством ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделять и количественно измерять олигосахариды посредством высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Выражения "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы", используемые в изобретении, относятся к антителам с содержанием фукозы около 0-15%.

Выражение "нормофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы", используемые в настоящем документе, относятся к антителам с содержанием фукозы более около 50%, как правило, более около 60, 70, 80 или более 85%.

Антитело к CD38, применяемое в способах изобретения, может индуцировать уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, путем апоптоза *in vitro*. Способы оценки апоптоза хорошо известны и включают, например, окрашивание аннексином IV с помощью стандартных способов. Антитела к CD38 способов изобретения могут индуцировать апоптоз на уровне около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% клеток.

Антитело к CD38, применяемое в способах изобретения, может индуцировать уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, *in vitro* путем модуляции ферментативной активности CD38. CD38 представляет собой многофункциональный эктофермент с активностью АДФ-рибозилциклазы 1, катализирующей образование циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и АДФР из НАД<sup>+</sup>, также обладающей функцией гидролизовать НАД<sup>+</sup> и цАДФР в АДФР. CD38 также катализирует обмен никотинамидной группы НАДФ<sup>+</sup> на никотиновую кислоту в условиях кислой среды с получением НКАДФ<sup>+</sup> (никотиновая кислота-адениндинуклеотидфосфат). Модуляцию ферментативной активности CD38 человека антителами к CD38, применяемыми в способах изобретения, можно измерять в анализе, описанном в публикации Graeff et al., J. Biol. Chem. 269:30260-7, 1994). Например, субстрат НГД<sup>+</sup> можно инкубировать с CD38, а модуляцию продукции циклической ГДФ-рибозы (цГДФР) можно отслеживать спектрофотометрически по возбуждению на длине волны 340 нм и испусканию на длине волны 410 нм в различные моменты времени после добавления антитела в различных концентрациях. Ингибирование синтеза цАДФР можно определять в соответствии со способом ВЭЖХ, описанным в публикации Munshi et al., J. Biol. Chem. 275:2156 6-71, 2000. Антитела к CD38, применяемые в способах изобретения, могут ингибировать ферментативную активность CD38 на по меньшей мере около 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

Антитела, которые по существу идентичны антителу, содержащему VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, могут использоваться в способах изобретения. Термин "по существу идентичный" означает, что сравниваемые аминокислотные последовательности VH или VL антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в VH и/или VL антитела, не оказывающие отрицательного влияния на свойства антитела. Процентное значение идентичности можно определять, например, путем попарного выравнивания с применением настроек по умолчанию в модуле AlignX программы Vector NTI v. 9. 0. 0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности настоящего изобретения можно применять в качестве искомой последовательности при осуществлении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, применяемых для выполнения таких поисков, являются программы XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Вестборо, штат Массачусетс, США) с применением настроек по умолчанию. Примеры замен, которые могут проводиться для антител, специфически связывающихся с CD38, применяемых в способах изобретения, представляют собой, например, консервативные замены на аминокислоты, имеющие аналогичный заряд, гидрофобные свойства или стереохимические характеристики. Также могут осуществляться консервативные замены для улучшения свойств антитела, например стабильности или аффинности, или для улучшения эффекторных функций антитела. Можно осуществить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, например, в VL и/или VH антитела к CD38. Более того, любой нативный остаток в тяжелой или легкой цепи также можно замещать аланином, как ранее было описано в отношении аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan et al., Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, 1998; Sasaki et al., Adv Biophys 35:1-24, 1998). Специалисты в данной области могут определять желательные аминокислотные замены, когда такие замены необходимы. Аминокислотные замены могут быть осуществлены, например, с помощью ПЦР-мутагенеза (патент США № 4,683,195). Библиотеки вариантов можно создавать с помощью хорошо известных способов, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Trp), и скрининга библиотек на варианты с желательными свойствами. Созданные варианты

можно тестировать на их связывание с CD38, их способность индуцировать ADCC, ADCP или апоптоз или модулировать ферментативную активность CD38 *in vitro* с применением способов, описанных в настоящем документе.

Термин "консервативные модификации" означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают в себя замещения, добавления и делеции аминокислот. Консервативными замещениями являются такие, при которых аминокислота заменена остатком аминокислоты с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (напр., аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (напр., лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (напр., аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (напр., глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (напр., фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (напр., глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (напр., аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (напр., треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Более того, любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki et al., (1988) *Adv Biophys* 35: 1-24). Аминокислоты в антителах настоящего изобретения можно заменить известными способами, например путем мутагенеза ПЦР (патент США № 4,683,195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных вариантов антител могут быть протестированы с применением анализов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело может связывать CD38 с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее около  $1 \times 10^{-7}$  М,  $1 \times 10^{-8}$  М,  $1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-10}$  М,  $1 \times 10^{-11}$  М,  $1 \times 10^{-12}$  М,  $1 \times 10^{-13}$  М,  $1 \times 10^{-14}$  М или  $1 \times 10^{-15}$  М по определению способом поверхностного плазмонного резонанса или KinExA, известного специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD38 человека с  $K_D$  менее около  $1 \times 10^{-8}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD38 человека с  $K_D$  менее около  $1 \times 10^{-9}$  М.

Аппаратура KinExA, анализы методами ELISA или конкурентного связывания известны специалистам в данной области. Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре антитело/CD38 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ), как правило, выполняются в стандартизированных условиях и с применением стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерения аффинности, например, с применением оборудования Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в контексте  $K_D$  характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для значения  $K_D$ , равного  $1 \times 10^{-9}$  М, составляет до  $\pm 0,33 \times 10^{-9}$  М.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих антител к CD38 или области VL и VH, идентифицированные *de novo*, как описано выше, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействия СНЗ между тяжелыми цепями моноспецифических антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как технологии, описанные в патенте США № 7,695,936; международной патентной публикации № WO 04/111233; патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2007/0287170; международной патентной публикации № WO 2008/119353; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/0286374; патентной публикации США № US 2011/0123532; международной патентной публикации № WO 2011/131746; международной патентной публикации № WO 2011/143545; или патентной публикации США № US 2012/0149876. Дополнительными биспецифическими структурами, в которые могут встраиваться области VL и/или VH антител настоящего изобретения, являются, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация № WO 2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например "лейциновую застежку-молнию" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441).

Например, биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в областях СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспе-

цифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD38) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СН3, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи; образуя таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубирования можно оптимально вернуть к невозстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиоэритритол (ДТЕ), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например, при pH 7,0 или при pH 7,4.

К возможным иллюстративным мутациям СН3 в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифического антитела относятся K409R и/или F405L.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 конъюгировано с токсином. Способы конъюгации и приемлемые токсины хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления субъект с АЛЦ является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/F) или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип FcγRIIIa-158F/V). CD16 также известен как Fc-гамма рецептор IIIa (FcγRIIIa) или низкоаффинный рецептор к Fc области иммуноглобулина гамма, изоформа III-A. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в положении остатка 158 белка FcγRIIIa влияет на аффинность FcγRIIIa к IgG человека. Рецептор с полиморфизмами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V демонстрирует сниженное взаимодействие с Fc и, таким образом, сниженную ADCC по сравнению с FcγRIIIa-158V/V. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах человека повышает способность антител индуцировать ADCC вследствие улучшенного связывания антител с FcγRIIIa (CD16) человека (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-40, 2002). С помощью стандартных способов можно проанализировать наличие у пациентов полиморфизма FcγRIIIa.

В изобретении также обеспечивается способ лечения субъекта с АЛЦ, включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение патогенных плазмочитов, экспрессирующих CD38, *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом субъект является гомозиготным по валину в положении 158 в CD16.

В изобретении также обеспечивается способ лечения субъекта с АЛЦ, включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, которое связывается с областью SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1), причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение патогенных плазмочитов, экспрессирующих CD38, *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом субъект является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16.

В изобретении также обеспечивается способ лечения пациента с АЛЦ, включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение патогенных плазмочитов, экспрессирующих CD38, *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом пациент является гомозиготным по валину в положении 158 в CD16.

В изобретении также обеспечивается способ лечения пациента с АЛЦ, включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, которое конкурирует за связывание CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение патогенных плазмочитов, экспрессирующих CD38, *in vitro* посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксич-

ности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38 *in vitro*, при этом пациент является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения пациента с АЛЦ, включающий определение гомозиготности или гетерозиготности пациента по валину в положении 158 в CD16; и

введение пациенту антитела к CD38,

которое конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5;

содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно; или

содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5 в течение времени, достаточного для излечения пациента.

В некоторых вариантах осуществления этап определения гомозиготности или гетерозиготности пациента по валину в положении 158 в CD16 проводится путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования.

Введение/фармацевтические композиции.

В способах настоящего изобретения возможно предоставление антитела к CD38 в приемлемых фармацевтических композициях, содержащих антитело к CD38 и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, эксципиент или несущую среду, с которыми вводят антитело к CD38. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4% солевой раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т.д. Концентрация антител к CD38 в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее около 0,5% мас., обычно, по меньшей мере от около 1 и до 15% мас., или 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50% мас., и будет преимущественно выбираться на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включая другие белки человека, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности см. стр. 958-989.

Способом введения антитела к CD38 может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное или подкожное, ингаляционное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие средства, известные специалистам в данной области техники.

Антитело к CD38 в способах настоящего изобретения можно вводить пациенту любым приемлемым путем, например, парентерально посредством внутривенной (в.в.) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно или подкожно, или внутривенно. В/в инфузия может осуществляться, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза антитела к CD38, вводимая пациенту, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 мг до около 100 мг/кг, например, от около 0,05 мг до около 30 мг/кг, или от около 5 мг до около 25 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг, или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м<sup>2</sup>. Для лечения АЛЦ обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антитела к CD38 в способах настоящего изобретения можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, антитело к CD38 можно вводить в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель, с после-

дующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 вводят в дозе 16 мг/кг один раз в неделю в течение 8 недель с последующим введением дозы 16 мг/кг один раз в две недели в течение 16 недель и с последующим введением дозы 16 мг/кг один раз в четыре недели до прекращения.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 вводят в дозе 8 мг/кг один раз в неделю в течение 8 недель с последующим введением дозы 8 мг/кг один раз в две недели в течение 16 недель и с последующим введением дозы 8 мг/кг один раз в четыре недели до прекращения.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 вводят в дозе 16 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель с последующим введением дозы 16 мг/кг один раз в две недели в течение 16 недель и с последующим введением дозы 16 мг/кг один раз в четыре недели до прекращения.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 вводят в дозе 8 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель с последующим введением дозы 8 мг/кг один раз в две недели в течение 16 недель и с последующим введением дозы 8 мг/кг один раз в четыре недели до прекращения.

Антитело к CD38 можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода 6 или более месяцев.

Например, антитело к CD38 можно вводить в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или альтернативно по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или в любой их комбинации.

Антитело к CD38 можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака. Это может быть особенно полезно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

Антитело к CD38 может быть лиофилизировано для хранения и восстановлено в соответствующем носителе перед использованием. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Подкожное введение фармацевтических композиций, содержащих антитело, которое специфически связывается с CD38 и с гиалуронидазой

Антитело к CD38 можно вводить подкожно в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу.

Концентрация антитела к CD38 в фармацевтической композиции для подкожного введения может составлять около 20 мг/мл.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 1200 мг до около 1800 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела к CD38.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать от около 30 000 Ед. до около 45 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1200 мг антитела к CD38 и около 30 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1800 мг антитела к CD38 и около 45 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 30 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 45 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическая композиция для подкожного введения может содержать гиалуронидазу гHuPH20 с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 22.

гHuPH20 представляет собой рекомбинантную гиалуронидазу (рекомбинантный HYLENEX®) и описана в международной патентной публикации № WO 2004/078140.

Гиалуронидаза представляет собой фермент, который разлагает гиалуроновую кислоту (ЕС 3.2.1.35) и снижает вязкость гиалуронана во внеклеточном матриксе, повышая таким образом проницаемость ткани.

SEQ ID NO: 22

MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLLIIPCCCLTLNFRAPPVIVNVPFLWAWNAPSEF  
 CLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDH  
 LDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK  
 AKQEFEKAGKDFLVEITIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPKPGYNGSCFNVEIKRNDLWS  
 LWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF  
 LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYI INVTLAAKMCSQV  
 LCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSC  
 KEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLLKPPMETEERQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL

Введение фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или дольше. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить один раз в неделю в течение восьми недель с последующим введением один раз в две недели в течение 16 недель с последующим введением один раз в четыре недели. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1200 мг антитела к CD38 и около 30 000 Ед. гиалуронидазы, причем концентрация антитела, которое специфически связывает CD38, в фармацевтической композиции составляет около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1800 мг антитела к CD38 и около 45 000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 30 000 Ед. гиалуронидазы. Фармацевтические композиции для введения могут содержать около 1600 мг антитела к CD38 и около 45 000 Ед. гиалуронидазы.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить подкожно в брюшную область.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD38 и гиалуронидазу, можно вводить общим объемом около 80 мл, 90 мл, 100 мл, 110 мл или 120 мл.

Для введения можно смешать 20 мг/мл антитела к CD38 в 25 мМ ацетате натрия, 60 мМ хлориде натрия, 140 мМ D-манните, 0,04% полисорбате-20, pH 5,5 с гHuPH20, 1,0 мг/мл (75-150 кЕд./мл) в 10 мМ L-гистидине, 130 мМ NaCl, 10 мМ L-метионине, 0,02% полисорбате-80, pH 6,5 перед введением смеси субъекту.

Комбинированные терапии.

Антитело к CD38 можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 в комбинации с ингибитором протеосом требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 в комбинации с ингибитором протеосом и кортикостероидом требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение антитела к CD38 в комбинации с ингибитором протеосом, кортикостероидом и циклофосфамидом требующему этого пациенту в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой ингибитор протеосом.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеосом представляет собой Velcade® (бортезомиб), или алкалоиды барвинка, например винкрестин, или антрациклин, такой как доксорубин.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой кортикостероид.

В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизон.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой циклофосфамид.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой производное глутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления производное глутаминовой кислоты представляет собой Thalomid® (талидомид), Revlimid® (леналидомид), Actimid® (CC4047).

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой Velcade® (бортезомиб), циклофосфамид, такой как Cytoxan® или Neosar®, Alkeran® (мелфалан), Thalomid® (талидомид), Revlimid® (леналидомид) или Pomalyst® (помалидомид), кортикостероид (дексаметазон),

альфа-интерферон (IFN- $\alpha$ ), трансплантацию стволовых клеток, Ninlaro® (иксазомиб) или NEOD001.

Бортезомиб можно вводить по 1,3 мг/м<sup>2</sup> подкожно дважды в неделю или один раз в неделю.

Циклофосфамид можно вводить внутривенно (прерывистая терапия): 40-50 мг/кг (400-1800 мг/м<sup>2</sup>) с распределением на 2-5 суток, возможно повторение с интервалами 2-4 недели; внутривенно (непрерывная суточная терапия): 60-120 мг/м<sup>2</sup>/сутки (1-2,5 мг/кг/сутки);

перорально (прерывистая терапия): 400-1000 мг/м<sup>2</sup> с распределением на 4-5 суток; или перорально (непрерывная суточная терапия): 50-100 мг/м<sup>2</sup>/сутки или 1-5 мг/кг/сутки.

Дексаметазон можно вводить по 40 мг в неделю или по 20 мг перед и после введения антитела к CD38.

Мелфалан можно вводить в дозе 9 мг/м<sup>2</sup> перорально один раз в сутки с 1-го по 4-й день каждого цикла вплоть до 9-го цикла.

Талидомид можно вводить в дозе 200 мг перорально один раз в сутки.

Леналидомид можно вводить в дозе 25 мг/сутки перорально с 1-го по 21-й день каждого цикла.

Помалидомид можно вводить в дозе 4 мг перорально с 1-го по 21-й день повторного 28-дневного цикла.

Иксазомиб можно вводить в дозе 24 мг/кг внутривенно каждые 28 дней.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом и циклофосфамидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом, циклофосфамидом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом, циклофосфамидом и дексаметазоном в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом и дексаметазоном в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с мелфаланом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом и мелфаланом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, в комбинации с бортезомибом, мелфаланом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и содержащего LCDR1, LCDR3 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соот-





Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с леналиномидом, циклофосфамидом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с леналиномидом, циклофосфамидом и дексаметазоном в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с помалиномидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с помалиномидом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с помалиномидом и дексаметазоном в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с талидомидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с талидомидом и кортикостероидом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с талидомидом и дексаметазоном в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

Изобретение также обеспечивает способ лечения амилоидоза легких цепей (АЛЦ), включающий введение требующему этого пациенту антитела к CD38, содержащего VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5, в комбинации с иксазомибом в течение времени, достаточного для излечения АЛЦ.

В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет резистентность к лечению ингибитором протеосом.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет резистентность к лечению циклофосфамидом.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет резистентность к лечению кортикостероидом.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет резистентность к лечению ингибитором протеосом, циклофосфамидом и кортикостероидом.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет резистентность к лечению Velcade® (бортезомибом), циклофосфамидом и дексаметазоном.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию антитела к CD38 и второго терапевтического агента можно вводить в любом удобном временном интервале. Например, антитело к CD38 и второй терапевтический агент можно вводить пациенту в один и тот же день и даже в одной и той же внутривенной инфузии. Однако антитело к CD38 и второй терапевтический агент также можно вводить в чередующиеся дни или чередующиеся недели, или месяцы и т.д. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 и второй терапевтический агент можно вводить достаточно близко во времени, чтобы они одновременно присутствовали на обнаруживаемых уровнях (напр., в сыворотке) у получающего лечение пациента. В некоторых вариантах осуществления полный курс лечения антителом к CD38 состоит из введения ряда доз в течение периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения вторым терапевтическим агентом, состоящий из ряда доз. Можно использовать период восстановления, длящийся 1, 2 или несколько дней или недель, между введением антитела к CD38 и второго терапевтического агента.

Антитело к CD38 или комбинацию антитела к CD38 и второго терапевтического агента можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включая внешнее направленное излучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), а также любой формой радиохирургии, включая гамма-нож, кибер-нож, Linac и внутритканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GliSite), и/или с хирургическим лечением.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты осуществления будут дополнительно описаны

в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

Дополнительные варианты осуществления изобретения Ниже изложены некоторые дополнительные варианты осуществления изобретения в соответствии с описаниями, представленными в других частях настоящего документа. Элементы из вариантов осуществления изобретения, изложенных выше, описанные как связанные с изобретением, раскрытым в настоящем документе, также относятся ко всем без исключения из этих дополнительно пронумерованных вариантов осуществления.

1. Антитело к CD38, которое конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента с CD38-положительной гематологической злокачественной опухолью, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

2. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 1, причем CD38-положительная гематологическая злокачественная опухоль представляет собой:

а) амилоидоз легких цепей (АЛЦ), множественную миелому (ММ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта (ЛБ), фолликулярную лимфому (ФЛ) или мантийноклеточную лимфому (МКЛ);

б) заболевание плазмочитов;

с) амилоидоз легких цепей (АЛЦ);

д) множественную миелому (ММ); или

е) макроглобулинемию Вальденстрема.

3. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 2, причем АЛЦ характеризуется сердечной стадией I, сердечной стадией II, сердечной стадией III и является рецидивирующим или рефрактерным.

4. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-3, причем HSCT:

а) является аллогенной, аутологичной или сингенной; или

б) содержит трансплантацию стволовых клеток крови, полученных из костного мозга, крови или амниотической жидкости.

5. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-4, причем антитело к CD38 вводят перед, во время или после HSCT.

6. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-5, причем пациенту перед HSCT была проведена химиотерапия и/или радиационная терапия.

7. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-6, причем антитело к CD38 связывается с областью SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLEAW-VIHGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).

8. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-7, причем антитело к CD38 содержит последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

9. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-8, причем антитело к CD38 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.

10. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-9, причем антитело к CD38 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности аминокислот с SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 13.

11. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 1-10, причем антитело к CD38 содержит тяжелую цепь, представляющую собой тяжелую цепь, с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

12. Антитело к CD38, которое конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении пациента с амилоидозом легких цепей.

13. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 12, причем пациент имеет резистентность к лечению ингибитором протеосом, циклофосфамидом и/или кортикостероидом.

14. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 13, причем ингибитором протеосом является Velcade® (бортезомиб).

15. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 13, 14, причем кортикостероидом является дексаметазон.

16. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-15, причем антитело к CD38 вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

17. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 16, причем второй терапевтический агент представляет собой ингибитор протеосом, циклофосфамид или кортикостероид.
18. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 16, 17, причем ингибитором протеосом является Velcade® (бортезомиб) или NINLARO® (иксазомиб).
19. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 16-18, причем кортикостероидом является дексаметазон.
20. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 16-19, причем вторым терапевтическим агентом является Velcade® (бортезомиб), NINLARO® (иксазомиб), Kyprolis® (карфилзомиб), Farydak® (панобиностат), циклофосфамид, Alkeran® (мелфалан), Thalomid® (талидомид), Revlimid® (леналидомид), Pomalyst® (помалидомид), дексаметазон или альфа-интерферон.
21. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-20, причем антитело к CD38 вводят в комбинации с ингибитором протеосом, циклофосфамидом и кортикостероидом.
22. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 21, причем ингибитором протеосом является Velcade® (бортезомиб).
23. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 21, 22, причем ингибитором протеосом является NINLARO® (иксазомиб).
24. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 21-23, причем кортикостероидом является дексаметазон.
25. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 21-24, причем ингибитором протеосом является Velcade® (бортезомиб), а кортикостероидом является дексаметазон.
26. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 21-25, причем ингибитором протеосом является NINLARO® (иксазомиб), а кортикостероидом является дексаметазон.
27. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 16-26, причем антитело к CD38 и второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или раздельно.
28. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 16-27, причем антитело к CD38 и второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или раздельно.
29. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 21-28, причем антитело к CD38, ингибитор протеосом, циклофосфамид и кортикостероид вводят одновременно, последовательно или раздельно.
30. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-29, причем АЛЦ характеризуется сердечной стадией I, сердечной стадией II, сердечной стадией III и является рецидивирующим или рефрактерным.
31. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-30, причем пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).
32. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-31, причем HSCT является аллогенной, аутологичной или сингенной.
33. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-32, причем HSCT содержит трансплантацию стволовых клеток крови, полученных из костного мозга, крови или амниотической жидкости.
34. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-33, причем антитело к CD38 вводят перед, во время или после HSCT.
35. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-34, причем пациенту перед HSCT была проведена химиотерапия и/или радиационная терапия.
36. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-35, причем пациенту дополнительно проводят радиотерапию.
37. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-36, причем антитело к CD38 не опосредует уничтожение CD34-положительных гемопоэтических клеток-предшественниц путем комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).
38. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-37, причем антитело к CD38 индуцирует уничтожение CD38-положительных плазмочитов путем антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38.
39. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-38, причем антитело к CD38 конкурирует за связывание с CD38 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 4 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 5.
40. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-39, причем антитело к CD38 связывается по меньшей мере с областью SKRNIQFSCKNLYR (SEQ ID NO: 2) и областью EKVQTLAWVINGG (SEQ ID NO: 3) CD38 человека (SEQ ID NO: 1).
41. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-40, причем

антитело к CD38 содержит аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи 1 (HCDR), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно и аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

42. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-41, причем антитело к CD38 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую последовательность аминокислот, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 5.

43. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-42, причем антитело к CD38 содержит VH с SEQ ID NO: 4 и VL с SEQ ID NO: 5.

44. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-43, причем антитело к CD38 содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 13.

45. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-44, причем антитело к CD38 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.

46. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-46, причем антитело к CD38 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3:

a) VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;

b) VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;

c) VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или

d) VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21, причем HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены по Rabat, Chothia или IMGT.

47. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 46, причем антитело к CD38 содержит:

e) VH с SEQ ID NO: 14 и VL с SEQ ID NO: 15;

f) VH с SEQ ID NO: 16 и VL с SEQ ID NO: 17;

g) VH с SEQ ID NO: 18 и VL с SEQ ID NO: 19; или h. VH с SEQ ID NO: 20 и VL с SEQ ID NO: 21.

48. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-47, причем антитело к CD38 является гуманизированным или человеческим.

49. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-48, причем антитело к CD38 относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

50. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-49, причем антитело к CD38 относится к изотипу IgG1.

51. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-50, причем антитело к CD38 вводят внутривенно.

52. Антитело к CD38 для применения согласно любому из вариантов осуществления 12-51, причем антитело к CD38 вводят подкожно в фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD38 и гиалуронидазу.

53. Антитело к CD38 для применения согласно варианту осуществления 42, в котором гиалуронидаза представляет собой гHuPH20 с SEQ ID NO: 22.

Пример 1. Материалы и способы.

Пациентам с ММ и АЛЦ проводили мобилизацию и отбор стволовых клеток крови по утвержденному IRB клиническому исследованию (Медицинский центр Тафтса IRB № 10680, "Доคลินิกские исследования DARZALEX™ (даратумумаба) в мобилизованных стволовых клетках и трансплантатах для пациентов с заболеваниями клональных плазмочитов"), требующему письменного информированного согласия. Мобилизованные стволовые клетки крови и клетки-предшественницы использовали для исследования влияния DARZALEX™ (даратумумаба) на рост CD34<sup>+</sup> клеток *in vitro*. Использовали как отобранные по CD34, так и не отобранные мобилизованные клетки-предшественницы крови от пациентов с ММ и АЛЦ. Оценивали влияние DARZALEX™ (даратумумаба) или антитела изотипического контроля на рост колоний клеток-предшественниц *in vitro* в анализах на полутвердой среде в качестве показателя воздействия DARZALEX™ (даратумумаба) на пролиферацию гемопоэтических CD34<sup>+</sup> клеток-предшественниц человека.

Анализы клеток-предшественниц в метилцеллюлозе, содержащей рекомбинантные цитокины (Stem Cell Technologies, г. Ванкувер, шт. Калифорния, США; № по кат. 04435), выполняли согласно инструкции изготовителя на отобранных по CD34 и не отобранных мобилизованных стволовых клетках крови с 1-го дня продуктов лейкофереза при разных концентрациях. Отбор по CD34 проводили с помощью устройства Miltenyi MiniMacs. Не отобранные по CD34 клетки использовали в концентрации 0,5×10<sup>4</sup>/мл, а отобранные по CD34 клетки - в концентрации 500 клеток/мл. Анализы выполняли с DARZALEX™ (даратумумабом) или с контрольным антителом в переменных концентрациях; в некоторых анализах клетки

наносили в среде, содержащей DARZALEX™ (даратумумаб) или контрольное антитело, а в других анализах клетки наносили после инкубации при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение одного часа в насыщенной компонентом сыворотке человека с DARZALEX™ (даратумумабом) или контрольным антителом. Колонии подсчитывали на 14-й день (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix).

Пример 2. CD38 экспрессируется на клональных плазмочитах АЛЦ.

Клональные плазмочиты пациентов с АЛЦ экспрессируют высокие уровни мРНК для CD38 на основании транскрипционных профилей плазмочитов костного мозга, сортированных по CD138<sup>+</sup> методом FACS (n=16, GEO GSE24128; Zhou et al., Clin Lymphoma Myeloma Leuk 12: 49-58, 2012), которые получены при постановке диагноза перед терапией (фиг. 1). Кроме того, в анализе иммунофенотипа плазмочитов костного мозга по CD138<sup>+</sup> от пациентов с впервые диагностированным АЛЦ, CD38 постоянно обнаруживали на клеточной поверхности во всех случаях (Paiva et al., Blood 117: 3613-6, 2011).

Пример 3. NK-клетки от пациентов с АЛЦ являются функционализированными и индуцируют ADCC, опосредованную DARZALEX™ (даратумумабом), против экспрессирующих CD38 клеток через три недели после трансплантации стволовых клеток (SCT)

Согласно утвержденному IRB протоколу исследований, который описан в примере 1 и требует письменного информированного согласия, NK-клетки (CD3-/CD56+/CD16+) получали от пациентов с АЛЦ через три недели после SCT и оценивали, определяя процент и число NK-клеток в образцах периферической крови, и активность *in vitro* этих эффекторных NK-клеток вместе с DARZALEX™ (даратумумабом) оценивали в анализах ADCC на плазмочитах человека (MM1S клетках) в качестве мишеней. MM1S клетки экспрессируют высокие уровни CD38, что делает их приемлемыми мишенями для DARA. Проточную цитометрию выполняли с использованием набора FlowCollect™ для характеристики естественных киллерных клеток человека (Millipore, г. Биллерика, шт. Массачусетс, США; № по кат. FCIM025164). Биоломинесцентные анализы цитотоксичности (Cell Technology; г. Маунтин-Вью, шт. Калифорния, США) выполняли, следуя инструкциям изготовителя. Концентрацию клеток-мишеней оптимизировали до 5000 клеток MM1S на лунку. Клетки-мишени инкубировали с DARZALEX™ (даратумумабом) или с контрольным антителом (IgG1 каппа человека, Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, шт. Миссури, США) на уровне 100 нг/мл в течение 15 минут при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Затем их добавляли в лунки с NK-клетками от пациентов в концентрации эффектор: клетка-мишень=10:1. Количество NK-клеток в каждой пробе рассчитывали на основе характеристики свежих образцов от пациентов методом проточной цитометрии. ADCC определяли путем вычисления величины люминесценции для каждого условия реагирования в соответствии с инструкциями изготовителя, используя стандартные контроли. Количество лизиса на ситуацию (% ADCC) определяли с помощью следующих расчетов:

$$\% \text{ ADCC} = (\text{проба}) - (\text{контроль 1}) - (\text{контроль 2}) \times 100 \\ (\text{контроль 3}) - (\text{контроль 1}).$$

Проба: проба с DARZALEX™ (даратумумабом).

Контроль 1: анализ с изотипическим контролем (целое спонтанное высвобождение).

Контроль 2: нет антитела, нет эффекторных клеток.

Контроль 3: максимальный лизис в присутствии реагента для лизиса.

Количество специфичного лизиса от DARZALEX™ (даратумумаба) вычисляли путем вычитания % ADCC с изотипическим контролем из % ADCC с DARZALEX™ (даратумумабом).

Как показано на фиг. 2, NK-клетки составляли почти одну треть от всех мононуклеарных клеток в периферической крови от пациентов с АЛЦ (n=9) через 3 недели после SCT. В биоломинесцентных анализах ADCC NK-клетки от пациентов с АЛЦ (n=6) в сочетании с DARZALEX™ (даратумумабом) имели 32% медианный специфичный лизис (интервал от -3 до 73%).

Пример 4. DARZALEX™ (даратумумаб) не индуцирует уничтожение гемопоэтических CD34<sup>+</sup> клеток-предшественниц, даже несмотря на высокий уровень экспрессии CD38, наблюдаемый в этих клетках

Экспрессию CD38 на CD34<sup>+</sup> клетках анализировали методом проточной цитометрии с применением APC-конъюгированного антитела к CD38 человека (HIT2, Biolegend, г. Сан-Диего, шт. Калифорния, США). CD34<sup>+</sup> клетки имели внешний вид миелобластов и экспрессировали высокие уровни CD38 (фиг. 3).

Влияние DARZALEX™ (даратумумаба) на рост CD34<sup>+</sup> клеток *in vitro* исследовали с использованием мобилизованных стволовых клеток и клеток-предшественниц крови от пациентов с ММ и АЛЦ, которым проводили мобилизацию и отбор стволовых клеток крови согласно утвержденному IRB клиническому исследованию, требующему информированного согласия, как описано в примере 1. Использовали как отобранные по CD34, так и не отобранные мобилизованные клетки-предшественницы крови от пациентов с ММ и АЛЦ, и оценивали влияние даратумумаба или изотипического контрольного антитела *in vitro* на рост колоний клеток-предшественниц в анализах на полутвердой среде в качестве показателя воздействия DARZALEX™ (даратумумаба) на пролиферацию гемопоэтических CD34<sup>+</sup> клеток-предшественниц человека.

Анализы клеток-предшественниц в метилцеллюлозе, содержащей рекомбинантные цитокины (Stem

Cell Technologies, г. Ванкувер, шт. Калифорния, США; № по кат. 04435), выполняли согласно инструкциям изготовителя на отобранных по CD34 или не отобранных мобилизованных стволовых клетках крови со 1-го дня продуктов лейкафереза при разных концентрациях. Отбор по CD34 проводили с помощью устройства Miltenyi MiniMacs. Не отобранные по CD34 клетки использовали в концентрации  $0,5 \times 10^4$ /мл, а отобранные по CD34 клетки - в концентрации 500 клеток/мл. Анализы выполняли с DARZALEX™ (даратумумабом) или с контрольным антителом в переменных концентрациях; в некоторых анализах клетки наносили в среде, содержащей DARZALEX™ (даратумумаб) или контрольное антитело, а в других анализах клетки наносили после инкубации при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение одного часа в насыщенной комплементе сыворотке человека с DARZALEX™ (даратумумабом) или контрольным антителом. Колонии подсчитывали на 14-й день (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix).

Оттаянные криоконсервированные не отобранные мобилизованные клетки-предшественницы крови вырастали в схожих количествах в CFU-GM (фиг. 4A) и BFU-E (фиг. 4B) в культурах с DARZALEX™ (даратумумабом) или в изотипическом контроле (500 или 1000 нг/мл), в сравнении с контролем без антител. В этих экспериментах оттаянные, не отобранные мобилизованные клетки-предшественницы крови наносили в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток на мл полутвердой среды (метилцеллюлозы) в присутствии DARZALEX™ (даратумумаба) или изотипического контроля (500 нг/мл или 1000 нг/мл). CFU-GM и GFU-E подсчитывали через две недели как процент CFU-GM в сравнении с контролем без антител. Стоит отметить, что в планшетах с 1000 нг/мл антител изотипического контроля было значительно больше CFU-GM по неясной причине.

Оценивали также влияние DARZALEX™ (даратумумаба) на свежие, не отобранные мобилизованные клетки-предшественницы крови. DARZALEX™ (даратумумаб) не приводил к снижению CFU-GM (фиг. 5A) или BFU-E (фиг. 5B). Как DARZALEX™ (даратумумаб), так и изотипический контроль повышали образование CFU-GM на схожих уровнях в сравнении с контролем без антител.

Оценивали способность DARZALEX™ (даратумумаба) индуцировать CDC в свежих, отобранных по CD34 гемопоэтических клетках-предшественницах. CD34<sup>+</sup> клетки инкубировали в 10% насыщенной комплементе сыворотке человека без антител с 500 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) или 500 нг/мл изотипического контроля в течение 1 часа, а затем наносили прямо в полутвердую среду. Оценивали образование колоний на 500 отобранных по CD34 клеток.

DARZALEX™ (даратумумаб) не приводил к снижению CFU-GM (фиг. 6A) или BFU-E (фиг. 6B), указывая на то, что данное антитело не индуцировало CDC на исходные клетки-предшественницы, отобранных по CD34, несмотря на экспрессию CD38 на этих клетках. По неясным причинам увеличение BFU-E наблюдали в пробах с обработкой DARZALEX™ (даратумумабом). DARZALEX™ (даратумумаб) увеличивал количество образованных BFU-E.

Влияние DARZALEX™ (даратумумаба) на свежие, отобранные по CD34 гемопоэтические клетки-предшественницы также испытывали путем нанесения клеток прямо в метилцеллюлозу, содержащую 500 нг/мл или 1000 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) или изотипического контроля, или контроля без антител. Образование колоний оценивали на 14-й день для CFU-GM на 500 клеток, отобранных по CD34 (фиг. 7A), или для BFU-E на 500 клеток, отобранных по CD34 (фиг. 7B). Не наблюдалось снижения образования колоний при любой концентрации DARZALEX™ (даратумумаба), что указывает на отсутствие токсичности DARZALEX™ (даратумумаба) для образования колоний CD34<sup>+</sup> клеток в данной системе анализа. На фиг. 6A, 6B и 7A показаны результаты для мобилизованных клеток-предшественниц крови от 1 пациента с MM и 2 пациентов с АЛЦ. На фиг. 7B показаны результаты для мобилизованных клеток-предшественниц крови от 2 пациентов с MM и 1 пациента с АЛЦ. Анализы на BFU-E в присутствии 500 нг/мл DARZALEX™ (даратумумаба) по неясным причинам содержали значительно больше BFU-E.

Пример 5. ADCC под действием NK-клеток пациента, опосредованная DARZALEX™ (даратумумабом), зависит от генотипа FcγRIIIA.

Геномную ДНК из клеток пациента использовали в анализе на основе ПЦР с применением ранее описанных способов и праймеров (Natjiharissi et al., Blood 110: 2561-2564, 2007). Ампликоны секвенировали и анализировали на полиморфизм по FcγRIIIA-158. Специфичный лизис от DARZALEX™ (даратумумаба) в анализах ADCC у пациентов с аллелями FcγRIIIA-158aa, кодирующими V/F и V/V, сравнивали с гомозиготами F/F.

Анализ на основе ПЦР показал, что из десяти пациентов, обследованных в данной работе, у шести пациентов был полиморфизм V/F или V/V, и они имели 60% медианную активность лизиса (31-98), а у 4 были аллели F/F и 17% медианный лизис (0-32) (фиг. 8; P < 0,05, двусторонний критерий Манна-Уитни).

Исходная корреляция между полиморфизмом Fc-рецепторов и ADCC под влиянием DARZALEX™ (даратумумаба) может рассматриваться в будущих клинических испытаниях.

Пример 6. Рандомизированное исследование 3-й фазы для оценки эффективности и безопасности DARZALEX™ (даратумумаба) в комбинации с циклофосфамидом, бортезомибом и дексаметазоном (CyBorD) в сравнении с терапией только CyBorD в случаях впервые диагностированного системного амилоидоза АЛЦ

Проводили открытое исследование 3-й фазы на двух когортах, сравнивающее терапию DARZALEX™ (даратумумабом) в комбинации с CyBorD (циклофосфамидом, бортезомибом и дексаметазоном) и терапию только CyBorD на субъектах с впервые диагностированным амилоидозом ALiC.

В настоящее время не существует одобренных лекарственных средств для лечения амилоидоза ALiC. При отсутствии одобренного лечения, предписываются лекарственные средства, разработанные для лечения множественной миеломы. Комбинация CyBorD чаще всего применяется в ЕС и США как начальное лечение амилоидоза ALiC (Venner et al., Blood 119: 4387-4390, 2012; Mikhael et al., Blood 119:4391-4394, 2012; Jaggard et al., Hematologica 99:1479-1485, 2014; Palladini et al., Blood 126:612-615, 2015).

Главная цель.

Главная цель заключается в оценке полного гематологического ответа у пациентов с ALiC после лечения DARZALEX™ (даратумумабом) в комбинации с CyBorD в сравнении с лечением только CyBorD.

Вторичные цели.

Оценка выживаемости без прогрессирования заболевания на основании смертности по любым причинам и прогрессирования заболевания (прогрессирование заболевания, включая прогрессирование заболевания по гематологии и прогрессирование заболевания в органах согласно единым рекомендациям); оценка показателей ответа в органах (OrRR) (Comenzo 2012):

почки, сердце, печень;

оценка показателей уровня гематологического ответа (ORR) и показателей уровня гематологического ответа VGPR или улучшенного уровня (т.е. полный ответ+VGPR);

оценка показателей прогрессирования в органах для сердца, почек, печени;

оценка длительности и времени до гематологической CR и VGPR или улучшенной реакции соответственно;

оценка длительности и времени до ответа в органах;

оценка безопасности и переносимости DARZALEX™ (даратумумаба) при введении в комбинации с CyBorD;

оценка фармакокинетики DARZALEX™ (даратумумаба);

оценка иммуногенности DARZALEX™ (даратумумаба);

оценка терапевтического эффекта по отчетным результатам пациентов (PRO), включая анкетирование здоровья SF-36, измерения EuroQol-5 (EQ-5D-5L) и QLQ-C30 Европейской организации по исследованиям и лечению раковых заболеваний (EORTC).

Поисковые цели.

Оценка биомаркеров ответа, включая высокочувствительный (ВЧ) тропонин T;

исследование биомаркеров для прогноза ответа или резистентности к терапии;

исследование статуса минимального остаточного заболевания у пациентов с амилоидозом.

Критерии оценивания.

Основной критерий оценивания.

Главным критерием оценивания являются показатели полного гематологического ответа.

Вторичные критерии оценивания

Вторичные критерии оценивания эффективности включают в себя:

выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS) на основании смертности по любым причинам;

показатели ответа в органах (OrRR) для почек, сердца, печени;

общую выживаемость (OS);

время до следующего лечения (TNT);

время до прогрессирования заболевания (TTP);

время до гематологического прогрессирования заболевания;

общий гематологический ответ;

показатели гематологической реакции VGPR или улучшенной реакции;

время до полного гематологического ответа (или VGPR, или улучшенного ответа);

длительность полного гематологического ответа (или VGPR, или улучшенного ответа);

время до ответа в органе;

длительность ответа в органе;

оценку воздействия лечения по отчетным результатам пациентов, включая EORTC QLQ-C30, короткую форму 36 обследования здоровья (SF-36) и европейскую анкету оценивания качества жизни по пяти показателям (EQ-5D-5L).

Поисковая конечная точка.

Поисковой конечной точкой является оценка статуса минимального остаточного заболевания у пациентов, которые достигли полного гематологического ответа в костном мозге и крови.

Гипотеза.

Главная гипотеза данного исследования заключается в том, что DARZALEX™ (даратумумаб) в

комбинации с CyBoRD будет улучшать показатели полного гематологического ответа в сравнении с терапией только CyBoRD у субъектов с впервые диагностированным амилоидозом ALЦ.

План исследования.

Это многоцентровое открытое исследование 3-й фазы, проводимое в двух когортах, в ходе которого сравнивают терапию DARZALEX™ (даратумумабом) в комбинации с CyBoRD и терапию только CyBoRD у субъектов с впервые диагностированным ALЦ. Приблизительно 360 субъектов в двух рандомизированных когортах, которые исходно получали либо CyBoRD, либо DARZALEX™ (даратумумаб) в комбинации с CyBoRD, стратифицировали по сердечному риску (стадии I, II и IIIa). Каждый цикл длился 4 недели. DARZALEX™ (даратумумаб) вводили в дозе 16 мг/кг один раз в неделю в течение первых 2 циклов (8 недель) лечения, затем один раз в 2 недели в течение 4 циклов (16 недель), а затем каждые 4 недели до максимальных 6 циклов терапии (24 недели) наряду с основой CyBoRD (в обеих когортах). Субъекты, рандомизированные в группу с введением DARZALEX™ (даратумумаба), могли продолжать прием DARZALEX™ (даратумумаба) каждые 4 недели после 6 циклов до прогрессирования заболевания в течение максимум 2 лет. Субъекты еженедельно получали 300 мг/м<sup>2</sup> циклофосфида перорально, либо внутривенно, 1,3 мг/м<sup>2</sup> бортезомиба подкожно и 40 мг дексаметазона в неделю. Циклы повторялись каждые 4 недели. Максимальное число проводимых циклов: 6.

Перед рандомизацией 6 субъектам, получавшим DARZALEX™ (даратумумаб) плюс CyBoRD, проводили предварительные безопасные введения в течение по меньшей мере 1 цикла, чтобы подтвердить безопасность комбинированного режима. Дозировки у этих 6 субъектов разносились таким образом, что субъекты получали первую дозу не раньше, чем через 48 часов после предшествующего задействованного в исследовании субъекта. Оценку безопасности выполняли организатор и сторонние эксперты после завершения по меньшей мере 1 цикла для 6 субъектов перед началом рандомизированной части протокола. Субъекты с предварительным введением проходили все запланированные оценки согласно T&E и участвовали в оценке общей безопасности режима введения DARZALEX™ (даратумумаба)+CyBoRD. Тем не менее, эти субъекты не включены в общую оценку эффективности.

Выбор субъектов.

Критерии включения.

1. Субъект должен быть не младше 18 лет.
2. Гистопатологический диагноз амилоидоза или заболевания отложения легких цепей, основанный на обнаружении методом поляризационной микроскопии зеленого двоякопреломляющего материала в образцах ткани, окрашенных конго-красным, или характерного вида в электронной микроскопии.
3. Показатели заболевания амилоидозом легких цепей, как определено по меньшей мере одним из следующего: моноклональный белок сыворотки  $\geq 0,5$  г/дл по электрофорезу белка,  $> 200$  мг моноклонального белка в моче за 24 ч по электрофорезу, свободные легкие цепи в сыворотке  $\geq 5,0$  мг/дл с ненормальным каппа: лямбда соотношением или разность между сложными и несложными свободными легкими цепями (dFLC)  $\geq 5$  мг/дл.
4. У пациента должен быть впервые диагностирован амилоидоз ALЦ без предварительной системной терапии. Единственное исключение заключается в том, что субъекты могут проходить до 4 недель терапии бортезомибом, циклофосфамидом и/или дексаметазоном (или равноценным стероидом) перед рандомизацией по экстренным показаниям, если субъект нуждается в срочной терапии.
5. Общее состояние (PS) 0, 1 или 2 по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG).
6. Перед началом лечения субъект должен получить клинические лабораторные показатели, которые отвечают следующим критериям на фазе скрининга:
  - i) абсолютное число нейтрофилов  $> 1,0 \times 10^9$ /л;
  - ii) уровень гемоглобина  $> 7,5$  г/дл ( $> 5$  ммоль/л); (допускается переливание крови для поддержания Hb  $> 7,5$ );
  - iii) число тромбоцитов  $> 50 \times 10^9$ /л; допускается трансфузия тромбоцитов;
  - iv) уровень аланинаминотрансферазы (ALT)  $< 2,5$  раза верхнего предела нормы (ULN);
  - v) уровень аспартатаминотрансферазы (AST)  $< 2,5$  раза верхнего предела нормы (ULN);
  - vi) уровень общего билирубина  $< 1,5 \times \text{ULN}$  (за исключением синдрома Жильбера: прямой билирубин  $< 2 \times \text{ULN}$ );
  - vii) клиренс креатинина  $\geq 20$  мл/мин; следует учесть, что клиренс креатинина можно либо измерять по исследованию суточной мочи, либо рассчитывать по утвержденной формуле, такой как MDRD, СКD-epi или Кокрофта-Голта (подробнее см. в приложении 3);
  - viii) ТТГ и свободный Т4 в пределах нормы. Пациенты могут проходить терапию тиреоидными гормонами при необходимости коррекции сопутствующего гипотиреоза.
7. Женщины детородного возраста должны постоянно применять высокоэффективный способ контроля рождаемости за 4 недели до начала лечения, во время терапии, во время перерывов между введением доз, и продолжать в течение 4 недель после прекращения введения исследуемого лекарственного средства. Контроль рождаемости должен соответствовать местным правовым нормам в отношении при-

меняемых способов контроля рождаемости для субъектов, участвующих в клинических исследованиях, например утвержденного применения пероральных, инъекционных или имплантационных гормональных противозачаточных средств;

размещения внутриматочных спиралей или внутриматочных систем; барьерных способов: применение презерватива со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием или преграждающего колпачка (мембраны или шеечного/влагалищного колпачка) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием (если медицински противопоказана гормональная или внутриматочная контрацепция, то можно применять 2 или другие эффективные или высокоэффективные способы); стерилизации мужчины-партнера (у данного субъекта должен быть единственный партнер с вазэктомией); полного воздержания (если это согласуется с желательным и привычным образом жизни субъекта) во время и после исследования (3 месяца после введения последней дозы DARZALEX™ (даратумумаба) для женщин).

8. Мужчина в сексуальных отношениях с женщиной детородного возраста и не подвергавшийся вазэктомии должен согласиться на применение барьерного способа контроля рождаемости, например, либо презерватива со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием, либо преграждающего колпачка (мембраны или шеечного/влагалищного колпачка) со спермицидной пеной/гелем/пленкой/кремом/суппозиторием у партнера. Все мужчины также не допускаются к донорству спермы во время исследования и в течение 3 месяцев после получения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

9. Женщина детородного возраста на этапе скрининга должна иметь 2 отрицательных теста мочи или сыворотки крови на беременность, первый от 10 до 14 дней перед введением дозы и второй в пределах 24 ч перед введением дозы.

10. Каждый субъект должен подписать форму информированного согласия (ICF), указывая что он/она понимает цели и процедуры, которые требуются для исследования, и добровольно участвует в исследовании. Субъекты должны добровольно соблюдать указанные в настоящем протоколе запреты и ограничения и быть к ним готовыми в соответствии с положениями ICF.

Критерии исключения.

1. Предшествующая терапия амилоидоза АЛЦ или множественной миеломы, за исключением одного цикла (не более 4 недель) с введением бортезомиба, циклофосфида и/или дексаметазона (или равноценным стероидом), перед рандомизацией.

2. Предшествующий или текущий диагноз симптоматической множественной миеломы, определенной по критериям CRAB, включая наличие литической костной болезни, плазмцитомы и/или гиперкальциемии.

3. Признаки серьезных сердечно-сосудистых заболеваний, как указано ниже:

a) NT-ProBNP > 8500 нг/л;

b) сердечная недостаточность класса IIIВ или IV согласно Нью-йоркской ассоциации кардиологов (NYHA);

c) нестабильная стенокардия или инфаркт миокарда в пределах 6 месяцев перед введением первой дозы;

d) атриовентрикулярная (AV) блокада 2 или 3 степени или синдром слабости синусового узла, если субъект не имеет кардиостимулятора (допускается AV блокада типа I любой степени по Мобицу);

e) известная в анамнезе непрерывная желудочковая тахикардия (> 30 секунд) или сердечный обморок. Известная в анамнезе возвратная, прерывистая желудочковая тахикардия (> 3 ударов), несмотря на антиаритмическую терапию;

f) скрининговая ЭКГ с 12 отведениями, показывающая скорректированный интервал QT базовой линии (QTcF) > 470 мс;

g) систолическое артериальное давление лежа < 90 мм рт. ст., или симптоматическая ортостатическая гипотензия, или снижение систолического артериального давления стоя на > 20 мм. рт. ст. несмотря на медицинское лечение (например, мидодрин, флудрокортизон);

h) фракция выброса левого желудочка (LVEF) на трансторакальной эхокардиограмме, MUGA сканировании, МРТ сердца или сердечной катетеризации < 40%. Требуется оценка во время скрининга.

4. Исключаются субъекты, планирующие проведение трансплантации стволовых клеток в течение первых шести циклов терапии по протоколу. Отбор стволовых клеток в течение первых шести циклов терапии по протоколу допускается.

5. Диагноз или лечение иных злокачественных заболеваний, отличных от АЛЦ, за исключением:

a) терапия злокачественного заболевания была направлена на излечение, и известные активные проявления болезни отсутствовали в течение ≥ 5 лет перед рандомизацией;

b) в достаточной степени излеченный немеланомный рак кожи или злокачественное лентиго без признаков заболевания;

c) в достаточной степени излеченная карцинома in situ (например, шейка матки, молочная железа) без признаков заболевания.

6. Субъект с известным хроническим обструктивным легочным заболеванием (COPD), с принудительным объемом выдоха за 1 секунду (FEV1) < 50% от нормального прогноза. Следует отметить, что требуется исследование FEV1 для пациентов с подозрением на COPD, и субъекты с FEV1 < 50% от нормального прогноза должны быть исключены.

7. Субъект имеет известную умеренную или тяжелую форму стойкой астмы в течение последних 2 лет (см. приложение 5) или имеет текущую неуправляемую астму любой классификации. (Следует отметить, что субъекты с текущей управляемой периодической астмой или управляемой умеренной стойкой астмой допускаются к участию в исследовании).

8. Субъект с известной положительной серологической реакцией на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), с известной положительной реакцией на поверхностный антиген гепатита В или с известным в анамнезе гепатитом С.

9. Чувствительная (степень 3) или болезненная (степень 1) периферическая нейропатия.

10. Известная повышенная чувствительность к бортезомибу, бору или манниту.

11. Субъект имеет сопутствующее медицинское состояние или заболевание (например, активную системную инфекцию), которое будет препятствовать процедурам или влиять на результаты исследования, либо, по мнению исследователя, будет представлять опасность для участия в данном исследовании.

12. Любая форма вторичного или наследственного (ATTR) амилоидоза.

13. Субъект имеет известные виды аллергии, гиперчувствительности, или непереносимости моноклональных антител или белков человека, или эксципиентов (см. брошюру для исследователя), или известную чувствительность к продуктам, полученным из млекопитающих.

14. У субъекта известна или подозревается неспособность к выполнению протокола исследования (например, по причине алкогольной, наркотической зависимости, психологического расстройства), либо субъект имеет любые обстоятельства, из-за которых, по мнению исследователя, участие будет противоречить интересам субъекта (например, снижать благосостояние), или которые могут препятствовать, ограничивать или искажать определяемые протоколом оценки.

15. Субъект является беременной или кормящей грудью женщиной либо планирует беременность во время участия в данном исследовании или в пределах 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

16. Субъект принимал экспериментальное лекарственное средство (включая экспериментальные вакцины) или применял инвазивное экспериментальное медицинское устройство в пределах 4 недель до начала 1-го дня 1-го цикла (за исключением экспериментальных агентов против миеломы, которые нельзя принимать в пределах 2 недель перед началом 1-го дня 1-го цикла, как описано в исключении № 3).

17. Субъекту проводилась обширная хирургическая операция в пределах 2 недель перед началом 1-го дня 1-го цикла, или он не полностью восстановился после операции, или запланирована хирургическая операция на время, когда ожидается участие субъекта в исследовании, или в пределах 2 недель после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства. Примечание. Допускаются к участию субъекты с запланированными хирургическими вмешательствами, которые проводятся под местной анестезией.

Оценка степени безопасности.

Степень безопасности будет оценена по неблагоприятным событиям, результатам лабораторных испытаний, ЭКГ, показателям жизненных параметров, данным медицинского осмотра и общему состоянию по ECOG. Любые клинически важные изменения, происходящие за время исследования, будут зарегистрированы в разделе неблагоприятных событий eCRF. Любое клинически значимое отклонение от нормы, которое сохраняется к концу исследования/его досрочному прекращению, будет наблюдаться исследователем до его устранения или до достижения клинически стабильного состояния.

Эффективность.

Категории по ответу.

Оценку заболевания следует выполнять каждые 28 дней в предусмотренный расписанием день оценки ( $\pm 3$  дня). Если лечение было задержано по любой причине, то оценку заболевания следует выполнять согласно расписанию, независимо от любых изменений режима дозирования.

Оценку заболевания следует выполнять в центральной лаборатории (если не установлено иное) согласно расписанию по времени и по событиям до наступления прогрессирования заболевания. В данном исследовании будут применяться согласованные рекомендации по критериям ответа на лечение амилоидоза АЛЦ (Comenzo et al., *Leukemia* 26: 2317-2325, 2012), которые представлены ниже. При оценке свободных легких цепей, количества иммуноглобулина, М-белка и определения иммунофиксации по сыворотке и суточной моче исследователь будет пользоваться результатами, предоставленными центральной лабораторией.

Субъекты с положительным IFE сыворотки и подтвержденной IFE интерференцией DARZALEX™ (даратумумаба), которые отвечают всем другим клиническим критериям полного ответа (CR), будут считаться субъектами, имеющими CR.

Согласованные рекомендации по международным единым критериям ответа.

Гематологический ответ и критерии прогрессирования	
Категория по ответу	Критерии
Завершено	Нормализация уровней и соотношения свободных легких цепей, отрицательная иммунофиксация в сыворотке крови и моче
Очень хороший частичный	Уменьшение dFLC < 40 мг/л
Частичный	Более чем 50% снижение dFLC
Нет ответа	Менее PR
Прогрессирование	От CR, любой обнаруживаемый моноклональный белок или ненормальное соотношение свободных легких цепей (легкие цепи должны быть двойными) От PR, 50% возрастание М-белка в сыворотке до > 0,5 г/дл, или 50% возрастание М-белка в моче до > 200 мг/сут (должен наблюдаться видимый пик) Увеличение свободных легких цепей на 50% до > 100 мг/л
Сокращения: CR, полный ответ; dFLC, разность между сложенными (iFLC) и несложенными (FLC) свободными легкими цепями; FLC, свободные легкие цепи; PR, частичный ответ	

Пример 7. Рандомизированное исследование 2-й фазы для оценки эффективности и безопасности DARZALEX™ (даратумумаба) как единственного агента для лечения субъектов с системным амилоидозом ALЦ.

Проводится открытое исследование 2-й фазы для оценки безопасности и эффективности DARZALEX™ (даратумумаба) как единственного агента у субъектов с системным амилоидозом ALЦ, которые раньше проходили лечение.

Приблизительно 40 субъектов были рандомизированы в две когорты, из которых одна получала DARZALEX™ (даратумумаб), а другая получала плацебо.

Взрослые пациенты в возрасте 18 лет и старше с подтвержденным биопсией системным амилоидозом ALЦ, которые не достигли CR или VGPR после начального лечения, включая пациентов с сердечной стадией I и II по клинике Майо и включая пациентов со стадией III только с NT-proBNP ≤ 5000 нг/л (или BNP ≤ 1000 нг/л).

Схема дозирования.

Рассмотрены два режима дозирования.

Режим 1.

Вводить DARZALEX™ (даратумумаб) дозами по 16 мг/кг внутривенно, один раз в неделю × 8 доз, один раз в две недели × 8 доз и затем каждые 4 недели до 6 циклов. После 6 циклов пациенты будут продолжать прием DARZALEX™ (даратумумаба) каждые 4 недели до прогрессирования или избирательно-го прекращения.

Режим 2

Вводить даратумумаб дозами в течение шести 28-дневных циклов по 16 мг/кг внутривенно.

В первом цикле вводить DARZALEX™ (даратумумаб) каждую неделю в 1-й, 8-й, 15-й и 22-й дни.

Во 2-м и 3-м циклах вводить DARZALEX™ (даратумумаб) каждую вторую неделю в 1-й и 15-й дни.

С 4-го по 6-й циклы вводить DARZALEX™ (даратумумаб) каждую 4-ю неделю в 1-й день.

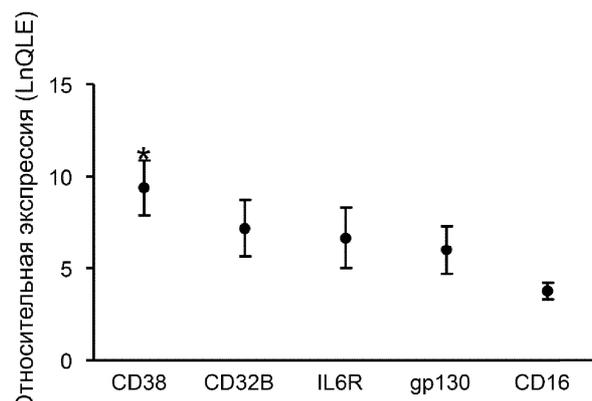
Главная цель, вторичные цели, основные критерии включения и основные критерии исключения аналогичны тем, которые описанным в примере 6.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента с амилоидозом легких цепей (ALЦ), включающий введение антитела против CD38 пациенту, который в этом нуждается, в течение времени, достаточного для излечения ALЦ, где антитело против CD38:

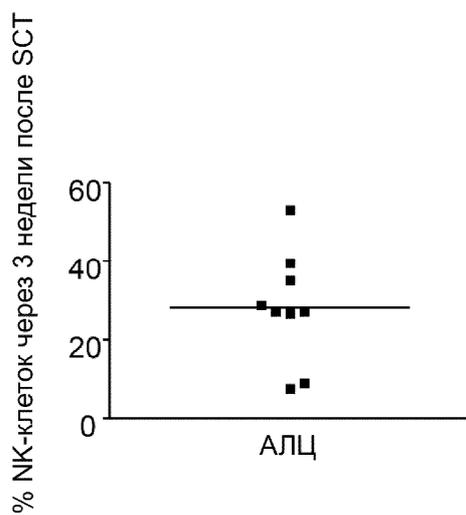
содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6, 7, и 8 соответственно, и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;

- относится к изотипу IgG1; и  
вводится в комбинации с терапевтическим агентом, содержащим ингибитор протеасом, циклофосфамид, кортикостероид или их комбинацию.
2. Способ по п.1, в котором терапевтический агент содержит ингибитор протеасом, циклофосфамид и кортикостероид.
  3. Способ по п.1 или 2, в котором ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб.
  4. Способ по любому из пп.1-3, в котором кортикостероид представляет собой дексаметазон.
  5. Способ по п.2, в котором ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб, а кортикостероид представляет собой дексаметазон.
  6. Способ по любому из пп.1-5, в котором антитело против CD38 и терапевтический агент вводят одновременно.
  7. Способ по любому из пп.1-5, в котором антитело против CD38 и терапевтический агент вводят раздельно.
  8. Способ по любому из пп.1-7, в котором ингибитор протеасом, циклофосфамид и/или кортикостероид вводят одновременно.
  9. Способ по любому из пп.1-7, в котором ингибитор протеасом, циклофосфамид и/или кортикостероид вводят раздельно.
  10. Способ по любому из пп.1-9, в котором антитело против CD38 не опосредует уничтожение CD34-положительных гемопоэтических клеток-предшественников путем комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).
  11. Способ по любому из пп.1-10, в котором антитело против CD38 индуцирует уничтожение CD38-положительных плазмочитов путем антителозависимой опосредованной клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или модуляции ферментативной активности CD38.
  12. Способ по любому из пп.1-11, в котором антитело против CD38 содержит тяжелую цепь вариабельной области (VH) с SEQ ID NO: 4 и легкую цепь вариабельной области (VL) с SEQ ID NO: 5.
  13. Способ по любому из пп.1-11, в котором антитело против CD38 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 12 и легкую цепь с SEQ ID NO: 13.
  14. Способ по любому из пп.1-11, в котором антитело против CD38 представляет собой даратумумаб.
  15. Способ по любому из пп.1-14, в котором антитело против CD38 вводят внутривенно.
  16. Способ по любому из пп.1-14, в котором антитело против CD38 вводят подкожно в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело против CD38 и гиалуронидазу.
  17. Способ по любому из пп.1-16, в котором пациенту впервые диагностировано АЛЦ.
  18. Способ по любому из пп.1-17, в котором АЛЦ характеризуется I стадией сердечной недостаточности, II стадией сердечной недостаточности, III стадией сердечной недостаточности, является рецидивирующим или рефрактерным.
  19. Способ по любому из пп.1-18, в котором пациент является устойчивым к лечению с помощью ингибитора протеасом, циклофосфамида и/или кортикостероида.
  20. Способ по любому из пп.1-19, в котором пациенту проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).
  21. Способ по п.20, в котором HSCT является аллогенной.
  22. Способ по п.20, в котором HSCT является аутологичной или сингенной.
  23. Способ по п.21 или 22, в котором HSCT включает трансплантацию стволовых кровяных клеток, полученных из костного мозга, крови или амниотической жидкости.
  24. Способ по п.23, в котором антитело против CD38 вводится прежде HSCT.
  25. Способ по п.23, в котором антитело против CD38 вводится в течение или после HSCT.
  26. Способ по пп.20-25, в котором пациенту завершили химиотерапию и/или радиотерапию до HSCT.
  27. Способ по любому из пп.1-16, в котором пациенту дополнительно проводят радиотерапию.

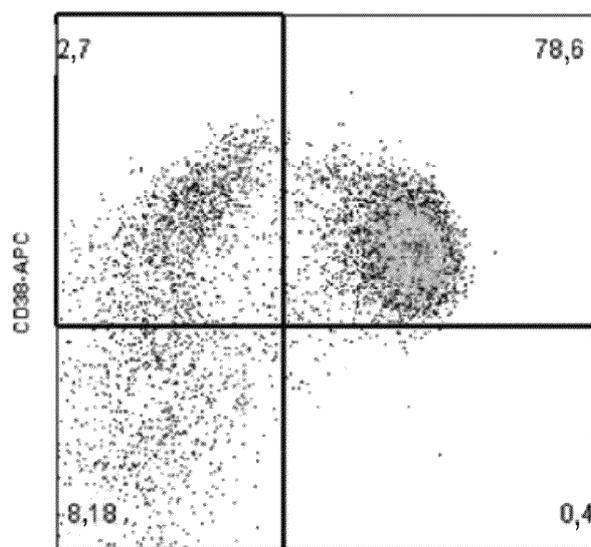


\*  $P < 0,01$  для *CD38* в сравнении со всеми другими, парный t-критерий (среднее  $\pm$  CO), (N = 16).

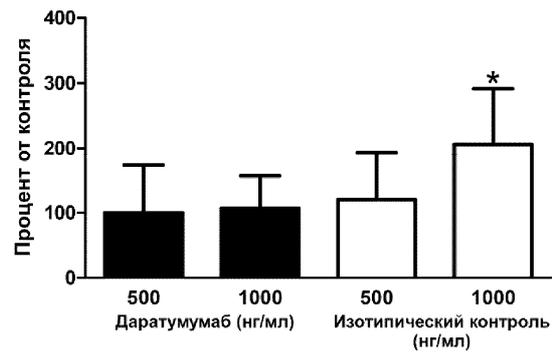
Фиг. 1



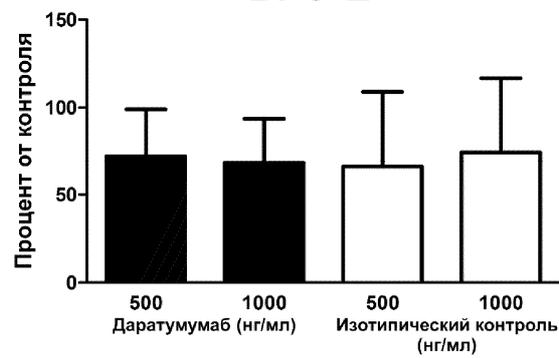
Фиг. 2



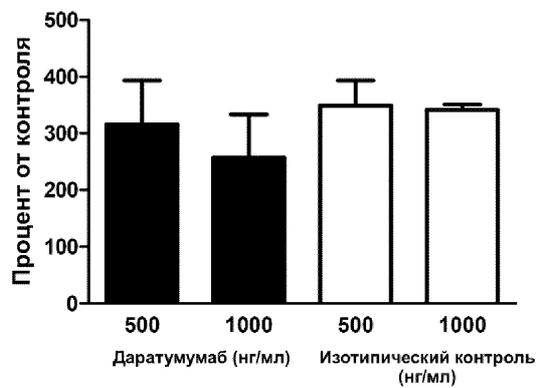
CD 34  
Фиг. 3

**CFU-GM**

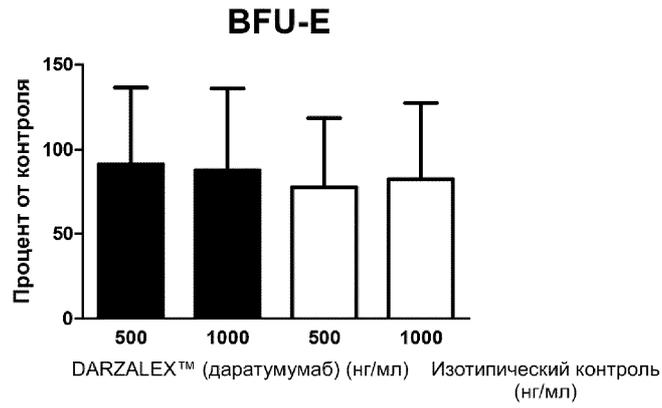
Фиг. 4А

**BFU-E**

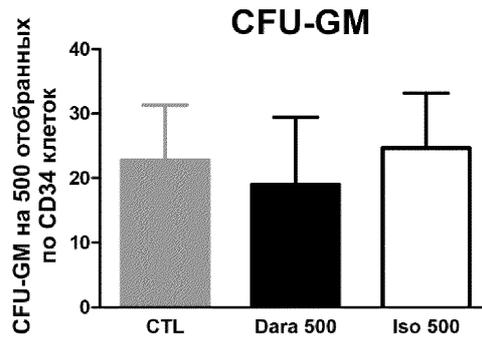
Фиг. 4В

**CFU-GM**

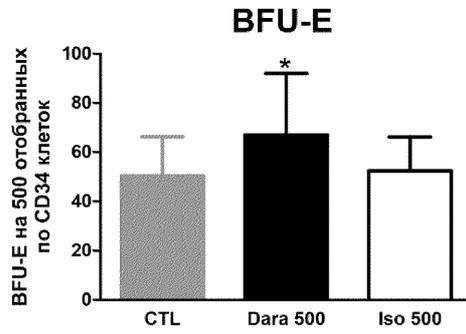
Фиг. 5А



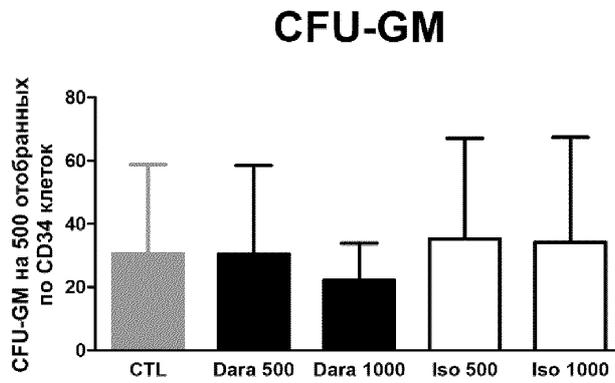
Фиг. 5B



Фиг. 6A

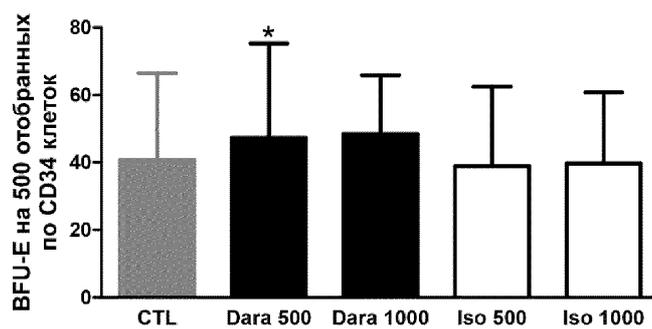


Фиг. 6B

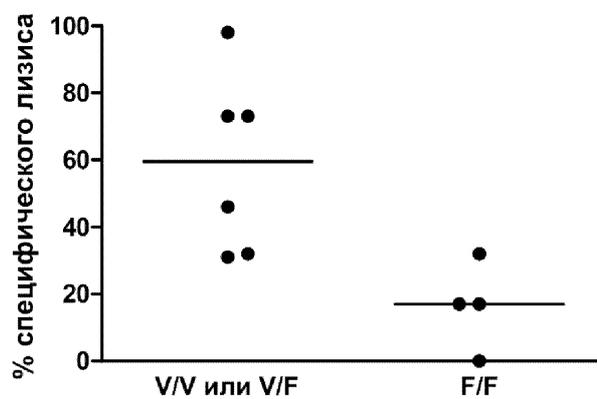


Фиг. 7A

## BFU-E



Фиг. 7В



Фиг. 8

