

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037929**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.08

(21) Номер заявки
201100694

(22) Дата подачи заявки
2006.03.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD38 ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **РА 2005 00429; US 60/667,579; US 60/696,163; US 60/728,561**

(32) **2005.03.23; 2005.04.01; 2005.07.01; 2005.10.20**

(33) **DK; US; US; US**

(43) **2012.02.28**

(62) **200702053; 2006.03.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Верс Мишель де, Граус Иво, Опринс Юдит, Паррен Пауль Паррен, Винкел Ян ван де, Вюгт Мартин ван (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И., Васильева Г.С., Дмитренко Е.Г. (RU)

(56) FERRERO ENZA et al., Characterization and phylogenetic epitope mapping of CD38 ADPR cyclase in the cynomolgus macaque, BMC Immunology, 2004, 5:21, Published: 21 September 2004. Найдено из Интернет: <URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/5/21>>, с. 1-13, фиг. 1, 6, табл. 3

HOSHINO SHIN-ICHI et al., "Mapping of the Catalytic and Epitopic Sites of Human CD38/NAD⁺ Glycohydrolase to a Functional Domain in the Carboxyl Terminus, The Journal Immunology, 1997, 158, pp. 741-747, особенно реферат, с. 745, фиг. 7, 9
WO-A2-1999062526
US-A1-20040202658

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с CD38 человека, и основанным на антителах биспецифичным и мультиспецифичным молекулам. Изобретение также касается фармацевтических композиций, включающих указанные антитела, и терапевтических и диагностических способов применения антител.

B1**037929****037929****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающим CD38, которые обладают специфическими характеристиками и которые применяются для лечения *inter alia* множественной миеломы.

Сведения о предшествующем уровне техники

Множественная миелома является злокачественным перерождением В-клеток, характеризующимся латентным накоплением в костном мозге секреторных плазматических клеток с низким пролиферативным индексом и увеличенной продолжительностью жизни. Это заболевание, в конечном счете, атакует кости и костный мозг, что приводит к множественным опухолям и повсеместному повреждению всей скелетной системы.

Приблизительно 1% всех раковых заболеваний и немногим более 10% всех злокачественных гематологических заболеваний можно отнести к множественной миеломе (ММ). Частота случаев ММ возрастает в стареющей популяции, где медиана возраста постановки этого диагноза приходится приблизительно на 61 год.

Доступные в настоящее время терапии множественной миеломы включают химиотерапию, трансплантацию стволовых клеток, Thalomid® (талидомид), Velcade® (ботремозид), Aredia® (памидронат) и Zometa® (золедроновая кислота). В настоящее время протоколы лечения, которые включают сочетание химиотерапевтических агентов, таких как винкристин, BCNU, мельфалан, циклофосфамид, адриамицин и преднизон или дексаметазон приводят к частоте полной ремиссии только около 5% и медиана выживаемости составляет приблизительно 36-48 месяцев от момента постановки диагноза. Недавние достижения при применении химиотерапии с высокими дозами с последующей трансплантацией аутологической ткани костного мозга или мононуклеарных клеток периферической крови привели к увеличению процента полной ремиссии и продолжительности ремиссии. Однако общая выживаемость только слегка увеличилась, и никаких доказательств излечения получено не было. В конечном итоге, все пациенты с ММ получают рецидив болезни даже при поддерживающей терапии интерфероном-альфа (IFN- α) самим по себе или в сочетании со стероидами.

Эффективность доступных режимов химиотерапевтического лечения при ММ ограничена низкой скоростью пролиферации клеток и развитием множественной устойчивости к лекарствам. У более чем 90% больных ММ заболевание становится устойчивым к химиотерапии. В результате идет поиск альтернативных режимов лечения с целью разработки адаптивной иммунотерапии, направленной на поверхностные антигены на плазматических клетках.

CD38 является примером антигена, экспрессируемого такими злокачественными плазматическими клетками, он экспрессируется при различных злокачественных заболеваниях крови, включая, но не ограничиваясь этим, хронический лимфоцитарный лейкоз В-клеток, острый лимфоцитарный лейкоз В-клеток, макроглобулинемию Валденстрема, первичный системный амилоидоз, лимфому клеток мантии, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, лейкоз NK-клеток и лейкоз плазматических клеток. Экспрессия CD38 описана для эпителиальных/эндотелиальных клеток различного происхождения, включая гранулярный эпителий простаты, островковые клетки поджелудочной железы, эпителий протоков в железах, включая околоушную железу, клетки бронхиального эпителия, клетки яичка и яичников и клетки опухоли аденокарциномы ободочной и прямой кишки. Заболевания, связанные с экспрессией CD38, включают, но не ограничиваются указанными бронхо-эпителиальными карциномами легких, рак груди (развившийся из злокачественной пролиферации эпителиальной выстилки протоков и долей груди), опухоли поджелудочной железы, опухоли, развившиеся из В-клеток, из эпителия кишечника (например, аденокарцинома и карцинома чешуйчатых клеток). В ЦНС нейробластома экспрессирует CD38. Другие заболевания включают карциному простаты, семиномы яичка и рак яичника.

В норме CD38 экспрессируется гемопоэтическими клетками в плотных тканях. Что касается гемопоэтических клеток, основная часть медуллярных тимоцитов является CD38⁺, покоящиеся и циркулирующие Т- и В-клетки являются CD38⁻, и активированные клетки являются CD38⁺. CD38 также экспрессируется у приблизительно 80% покоящихся NK-клеток и моноцитов и лимфобластами центра размножения лимфатического узла, плазматическими В-клетками и некоторыми внутрифолликулярными клетками. CD38 может также экспрессироваться древоидными клетками. Значительная часть нормальных клеток костного мозга, в особенности клетки предшественников, экспрессируют CD38. К тому же 50-80% кровяных клеток пуповины является CD38⁺ и остаются такими в крови человека в течение первых двух-трех лет жизни. В дополнение к лимфатическим клеткам предшественника CD38 также экспрессируется в эритроцитах и кровяных пластинках.

Что касается твердых тканей, CD38 экспрессируется в кишечнике интраэпителиальными клетками и лимфоцитами lamina propria, клетками Пуркинье и нейрофибрилярными клубками мозга, эпителиальными клетками простаты, β -клетками поджелудочной железы, остеокластами костей, ретинальными клетками глаза, сарколеммой гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры.

Функции, приписываемые CD38, включают как рецепторную роль в адгезии и передаче сигнала, так и (экто)ферментативную активность. Выступая в роли эктофермента CD38 применяет НАД⁺ в каче-

стве субстрата для образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и АДФР, а также никотинамида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ). Показано, что цАДФР является вторичным мессенджером для высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулюма. В добавок к передаче сигнала с помощью Ca^{2+} , опосредованная CD38 передача сигнала происходит посредством взаимодействия (cross-talk) с комплексами антиген-рецептор на Т- и В-клетках или другими типами рецепторных комплексов, например молекулами МНС, и таким образом включена в несколько клеточных ответов, а также в включение и секрецию IgG1.

Анти-CD38 антитела описаны в литературе, например в Lande R. et al., Cell Immunol. 220 (1), 30-8 (2002), Auciello C.M. et al., Tissue antigens 56(6), 539-547 (2000) and Cotner T. et al., Int. Immunopharmacol. 3(3), 255-268 (1981). У CD38 несколько функций, которые могут активироваться или не активироваться молекулой, связавшейся с CD38. Например, мышиные анти-CD38 антитела IB4 обладают агонистическими свойствами по отношению к CD38. Показано, что IB4 индуцируют активацию Т-клеток, на что указывает высвобождение (мобилизация) Ca^{2+} в клетках Jurkat (Zubiaur V. et al., J. Immunol. 159(1), 193-205 (1997)), индуцируют значительную пролиферацию моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), индуцируют высвобождение значительных уровней IL-6 и индуцируют высвобождение детектируемых уровней IFN- γ (Lande, Zubiaur Morra, Ansiello, supra).

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложено антитело, которое связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31) и которое не связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток серина в положении 274 был замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, где EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток серина в положении 274 был замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50%, например менее 10%, менее 5% или менее 1% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, которое связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31) и которое не связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток глутамина в положении 272 был замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело где EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток глутамина в положении 272 был замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), составляет менее 50%, например менее 10%, менее 5% или менее 1% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, которое связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток треонина в положении 237 был замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, где EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток треонина в положении 237 был замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), соответствует 75-125% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, где EC_{50} определяют с помощью ELISA, как описано в примере 17 описания.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое конкурирует за связывание с CD38 с антителом, кодируемым нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, включающими в их вариабельных участках нуклеотидные последовательности, определенные в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 16 соответственно.

В настоящем изобретении предложено антитело, где конкуренцию определяют с применением ELISA, как описано в примере 8 или 9 описания, где конкуренция определяется сигналом по крайней мере 90%, при оценке по поглощению или с помощью измерений перекрестного блокирования, как описано в примере 7 описания, где конкуренция определяется сигналом по крайней мере 90%, при оценке по флуоресценции.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое специфически связывается с эпитопом CD38, где эпитоп также специфически связывается антителом, кодируемым нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, включающими в их вариабельных участках нуклеотидные последовательности, определенные в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 16 соответственно.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое специфически связывается с участком SKRNIQFSCKNIIYR и участком EKVQTLEAWVIHGG в CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В настоящем изобретении предложено антитело, которое обладает одной или более из следующих характеристик:

- (1) действует как антагонист CD38;
- (2) не индуцирует значительную пролиферацию моноклеарных клеток периферической крови, как определяют по способу, описанному в примере 18 описания;

(3) не индуцирует высвобождение значительного количества IL-6 моноцитами человека или мононуклеарными клетками периферической крови, как определяют по способу, описанному в примере 19 описания;

(4) не индуцирует высвобождение детектируемого количества IFN- γ Т-клетками человека или мононуклеарными клетками периферической крови человека, как определяют по способу, описанному в примере 20 описания;

(5) интернализуется клетками, экспрессирующими CD38; например, интернализуется клетками CHO-CD38 в течение 5-15 мин при 37°C по способу, описанному в примере 12 описания;

(6) индуцируют ADCC; например, со значением EC₅₀ ниже 15 нг/мл, например ниже 10 нг/мл в клетках Daudi-luc, и со значением EC₅₀ ниже 75 нг/мл, например ниже 50 нг/мл, 30 нг/мл или 10 нг/мл в клетках MM, как определяют по способу, описанному в примере 5 описания;

(7) индуцирует CDC в присутствии комплемента, например, со значением EC₅₀ ниже 5 мкг/мл, например ниже 1 мкг/мл в клетках Daudi-luc или CHO-CD38 по способу, описанному в примере 6 описания;

(8) ингибирует синтез цГДФР;

(9) ингибирует синтез цАДФР;

(10) связывается с CD38 человека со сродством (K_D) ниже 10⁻⁸ М, например, в интервале от 10⁻⁸ М до 10⁻¹¹ М, например в интервале от 7×10⁻⁹ М до 10⁻¹⁰ М, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примере 20 описания.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое ингибирует синтез цГДФР по меньшей мере на 25%, например на 30% через 90 мин в концентрации 3 мкг/мл, как определяют с помощью спектрофотометрического способа, описанного в примере 24 описания.

В настоящем изобретении предложено антитело 2, которое ингибирует синтез цАДФР по меньшей мере, на 25%, например на 30% через 90 мин в концентрации 3 мкг/мл, как определяют с помощью ВЭЖХ.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое является моноклональным антителом человека.

В настоящем изобретении предложено антитело, характеризующееся тем, что оно является полно-размерным антителом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, например антителом IgG1, предпочтительно антителом IgG1, к или антителом IgM, предпочтительно антителом IgM, к.

В настоящем изобретении предложено антитело, где антитело является гликозилированным в эукариотической клетке.

В настоящем изобретении предложено антитело, дополнительно включающее хелатирующий линкер для присоединения радиоизотопа.

В настоящем изобретении предложено антитело, которое находится, по существу, в выделенной форме.

В настоящем изобретении предложен иммуноконъюгат, включающий антитело, описанное выше, связанное с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарственным средством.

В настоящем изобретении предложен иммуноконъюгат, включающий антитело, описанное выше, где антитело является мономерным антителом IgM, связанным с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарственным средством.

В настоящем изобретении предложена биспецифичная или мультиспецифичная молекула, включающая антитело, описанное выше, и обладающая специфичностью связывания в отношении эффекторной клетки человека.

В настоящем изобретении предложена биспецифичная или мультиспецифичная молекула, включающая антитело, описанное выше, и обладающая специфичностью связывания в отношении CD3, CD4, CD138, IL-15R, мембрано-связанного или связанного с рецептором TNF- α человеческого Fc рецептора или мембрано-связанного или связанного с рецептором IL-15.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело, описанное выше, или иммуноконъюгат, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая один или более дополнительных терапевтических агентов.

В настоящем изобретении предложен способ ингибирования роста и/или пролиферации клеток, экспрессирующих CD38, включающий введение антитела, описанного выше, или иммуноконъюгата, описанного выше, или фармацевтической композиции, описанной выше, так что рост и/или пролиферация клеток ингибируются.

В настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или нарушения, вовлекающего экспрессирующие CD38 клетки, у субъекта, где способ включает введение антитела, описанного выше, или иммуноконъюгата, описанного выше, или фармацевтической композиции, описанной выше, субъекту, в этом нуждающемуся.

В настоящем изобретении предложен способ профилактики заболевания или нарушения, связанно-

го с экспрессирующими CD38 клетками, у субъекта, где способ включает введение антитела, описанного выше, или иммуноконъюгата, описанного выше, или фармацевтической композиции, описанной выше, субъекту, в этом нуждающемуся.

В одном из вариантов реализации заболевание или нарушение является ревматоидным артритом.

В одном из вариантов реализации заболевание или нарушение является множественной миеломой.

В одном из вариантов реализации способ включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов субъекту.

В одном из вариантов реализации один или более дополнительных терапевтических агентов выбирают из химиотерапевтического агента, противовоспалительного агента или иммуносупрессивного агента и/или иммуномодуляторного агента.

В одном из вариантов реализации один или более дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из цисплатина, gefитиниба, цетуксимаба, ритуксимаба, бевацизумаба, эрлотиниба, бортезомиба, талидомида, памидроната, золедроновой кислоты, клодроната, ризендроната, ибандроната, этидроната, алендроната, тилудроната, триоксида мышьяка, леналидомида, филграстима, пегфилграстима, сарграмостима, субероиланилида гидроксамовой кислоты и SCIO-469.

Перечень фигур

Фиг. 1А показывает связывание -003, -005 и антитела контрольного изотипа HuMab-KLN с CD38-трансфицированными CHO (CHO-CD38) клетками при измерении с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 4.

Фиг. 1Б показывает связывание -024 и HuMab-KLN с CD38-трансфицированными CHO (CHO-CD38) клетками при измерении с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 4.

Фиг. 2А показывает связывание -003, -005 и HuMab-KLN с Daudi клетками при измерении с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 4.

Фиг. 2Б показывает связывание -024 и HuMab-KLN с Daudi клетками при измерении с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 4.

Фиг. 3 показывает связывание -003, -005, -024 и HuMab-KLN с клетками множественной миеломы. Постановка эксперимента описана в примере 4.

Фиг. 4А показывает способность -003 и -005 индуцировать лизис клеток Daudi посредством ADCC по сравнению с ритуксимабом и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 4Б показывает способность -024 индуцировать лизис клеток Daudi посредством ADCC по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 5А показывает способность -003, -005 и -024 индуцировать лизис свежих опухолевых клеток множественной миеломы посредством ADCC по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 5Б показывает способность -003, -005 и -024 индуцировать лизис свежих опухолевых клеток лейкоза плазматических клеток посредством ADCC по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 6 показывает способность -003 и -005 индуцировать лизис JK6L (клеток линии множественной миеломы) посредством ADCC по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 7 показывает способность -003 и -005 индуцировать лизис AMO-1 (клеток линии множественной миеломы) посредством ADCC по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 5.

Фиг. 8 показывает CDC-опосредованный лизис Daudi-luc клеток, индуцированный -003 и -005, по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 9А показывает CDC-опосредованный лизис CHO-CD38 клеток, индуцированный -003 и -005, по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 9Б показывает CDC-опосредованный лизис CHO-CD38 клеток, индуцированный -024, по сравнению с HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 10А показывает CDC-опосредованный лизис 3% устойчивых к лечению опухолевых клеток в присутствии -003, -005 и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 10Б показывает CDC-опосредованный лизис 9% устойчивых к лечению опухолевых клеток в присутствии -003, -005 и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 10В показывает CDC-опосредованный лизис 30-40% устойчивых к лечению опухолевых клеток в присутствии -003, -005 и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 10Г показывает CDC-опосредованный лизис 70% устойчивых к лечению опухолевых клеток в присутствии -003, -005 и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 10Д показывает CDC-опосредованный лизис клеток множественной миеломы в присутствии -024 и HuMab-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 6.

Фиг. 11 показывает, что -003 и -005 не проявляют перекрестного блокирования связывания с CD38. Постановка эксперимента описана в примере 7.

Фиг. 12А показывает иммуногистологическое окрашивание макрофагов, лимфоцитов и плазматических В-клеток с помощью -003. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 12Б показывает иммуногистологическое окрашивание бронхиального эпителия с помощью -003. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 12В показывает иммуногистологическое окрашивание миоцитов с помощью -003. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 12Г показывает иммуногистологическое окрашивание лимфоидной ткани обезьяны циномолгус с помощью -003. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 13А показывает иммуногистологическое окрашивание макрофагов, лимфоцитов и плазматических В-клеток с помощью -005. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 13Б показывает иммуногистологическое окрашивание бронхиального эпителия с помощью -005. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 13В показывает иммуногистологическое окрашивание миоцитов с помощью -005. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 13Г показывает иммуногистологическое окрашивание лимфоидной ткани обезьяны циномолгус с помощью -005. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 14А показывает иммуногистологическое окрашивание эндотелия печени с помощью CD31. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 14Б показывает иммуногистологическое окрашивание эндотелия печени с помощью vWF. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 14В показывает иммуногистологическое окрашивание эндотелия печени с помощью анти-KLN. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 14Г показывает иммуногистологическое окрашивание эндотелия печени с помощью -003. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 14Д показывает иммуногистологическое окрашивание эндотелия печени с помощью -005. Постановка эксперимента описана в примере 10.

Фиг. 15А показывает перекрестную реактивность -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLN на лимфоцитах обезьяны циномолгус, измеряемую с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 11.

Фиг. 15Б показывает перекрестную реактивность -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLN на моноцитах обезьяны циномолгус, измеряемую с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 11.

Фиг. 15В показывает перекрестную реактивность -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLN на PBMC обезьян резус, измеряемую с помощью проточной цитометрии. Постановка эксперимента описана в примере 11.

Фиг. 16А показывает интернализацию -003 при измерении по тушению флуоресценции этидий бромида. Постановка эксперимента описана в примере 12.

Фиг. 16Б показывает интернализацию -005 при измерении по тушению флуоресценции этидий бромида. Постановка эксперимента описана в примере 12.

Фиг. 17А показывает обусловленное -003 и -005 по сравнению с анти-CD20 моноклональным антигеном (ритуксимаб) и HuMab-KLN ингибирование роста опухолевых клеток в превентивной постановке при измерении с помощью *in vivo* SCID люциферазного получения изображения. Постановка эксперимента описана в примере 13.

Фиг. 17Б показывает обусловленное -003 и -005 по сравнению с анти-CD20 моноклональным антигеном (ритуксимаб) и HuMab-KLN ингибирование роста опухолевых клеток в терапевтической постановке I при измерении с помощью *in vivo* SCID люциферазного получения изображения. Постановка эксперимента описана в примере 13.

Фиг. 17В показывает обусловленное -003 и -005 по сравнению с анти-CD20 моноклональным антигеном (ритуксимаб) и HuMab-KLN ингибирование роста опухолевых клеток в терапевтической постановке II при измерении с помощью *in vivo* SCID люциферазного получения изображения. Постановка эксперимента описана в примере 13.

Фиг. 17Г показывает обусловленное -003 и -024 по сравнению с HuMab-KLN ингибирование роста опухолевых клеток в терапевтической постановке III при измерении с помощью *in vivo* SCID люциферазного получения изображения. Постановка эксперимента описана в примере 13.

Фиг. 18 показывает индукцию апоптоза с помощью -003 и -005 по сравнению с анти-CD20 моноклональным антигеном (ритуксимаб) и HuMab-KLN со сшивками и без. Постановка эксперимента описана в примере 14.

Фиг. 19 показывает гистологическую оценку CD38-положительных клеток в имплантированных RA-SCID гетеротрансплантатах мыши на 14 день после обработки анти-KLN (HuMab-KLN) или -005. Способы описаны в примере 15.

Фиг. 20 показывает гистологическую оценку CD138-положительных клеток в имплантированных RA-SCID гетеротрансплантатах мыши на 14 день после обработки анти-KLN (HuMab-KLN) или -005.

Способы описаны в примере 15.

Фиг. 21 показывает CD38 окрашивание В-клеток в гетеротрансплантатах перед имплантацией (А) или после обработки анти-KLH (Б) или -005 (В). Способы описаны в примере 15.

Фиг. 22 показывает CD138 окрашивание В-клеток в гетеротрансплантатах перед имплантацией (А) или после обработки анти-KLH (Б) или -005 (В). Способы описаны в примере 15.

Фиг. 23 показывает связывание -003 и -005 с диким типом и мутантным CD38 человека при измерении с помощью ELISA.

23А показывает связывание -003 и -005 с T237A мутантом CD38 человека.

23Б показывает связывание -003 и -005 с Q272R мутантом CD38 человека.

23В показывает связывание -003 и -005 с S274F мутантом CD38 человека. Способы описаны в примере 17.

Фиг. 24 показывает действие -003 и -005 по сравнению с HuMab-KLH на пролиферацию (А), продукцию IL-6 (Б) и продукцию IFN- γ (В) клетками PBMC человека. Способы описаны в примерах 18, 19 и 20 соответственно.

Фиг. 25 показывает ферментативную продукцию цГДФ-рибозы в присутствии различных концентраций -003 (Б), -005 (В), -024 (Г) или анти-KLH (А). Способы описаны в примере 23.

Фиг. 26 показывает сравнение между -003 -005 и Morphosys антителом TH-3079 при CDC клеток CHO-CD38 (26А), CDC клеток Daudi (26Б) и ADCC клеток Daudi (26В).

Последовательности согласно изобретению приведены в приложенном списке последовательностей.

SEQ ID NO: 1 является нуклеотидной последовательностью V_L участка антитела -003.

SEQ ID NO: 2 является аминокислотной последовательностью V_L участка антитела -003.

SEQ ID NO: 3 является аминокислотной последовательностью V_L CDR1 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 24-34 SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 является аминокислотной последовательностью V_L CDR2 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 50-56 SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 5 является аминокислотной последовательностью V_L CDR3 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 89-97 SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 6 является нуклеотидной последовательностью V_H участка антитела -003.

SEQ ID NO: 7 является аминокислотной последовательностью V_H участка антитела -003.

SEQ ID NO: 8 является аминокислотной последовательностью V_H CDR1 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 31-35 SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 является аминокислотной последовательностью V_H CDR2 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 50-66 SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 10 является аминокислотной последовательностью V_H CDR3 антитела -003, включающей аминокислотные остатки 99-109 SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 11 является нуклеотидной последовательностью V_L участка антитела -005.

SEQ ID NO: 12 является аминокислотной последовательностью V_L участка антитела -005.

SEQ ID NO: 13 является аминокислотной последовательностью V_L CDR1 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 24-34 SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 14 является аминокислотной последовательностью V_L CDR2 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 50-56 SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 15 является аминокислотной последовательностью V_L CDR3 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 89-97 SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 16 является нуклеотидной последовательностью V_H участка антитела -005.

SEQ ID NO: 17 является аминокислотной последовательностью V_H участка антитела -005.

SEQ ID NO: 18 является аминокислотной последовательностью V_H CDR1 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 31-35 SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 19 является аминокислотной последовательностью V_H CDR2 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 50-66 SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 20 является аминокислотной последовательностью V_H CDR3 антитела -005, включающей аминокислотные остатки 99-111 SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 21 является нуклеотидной последовательностью V_L участка антитела -024.

SEQ ID NO: 22 является аминокислотной последовательностью V_L участка антитела -024.

SEQ ID NO: 23 является аминокислотной последовательностью V_L CDR1 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 24-34 SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 24 является аминокислотной последовательностью V_L CDR2 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 50-56 SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 25 является аминокислотной последовательностью V_L CDR3 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 89-97 SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 26 является нуклеотидной последовательностью V_H участка антитела -024.

SEQ ID NO: 27 является аминокислотной последовательностью V_H участка антитела -024.

SEQ ID NO: 28 является аминокислотной последовательностью V_H CDR1 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 31-35 SEQ ID NO: 27.

SEQ ID NO: 29 является аминокислотной последовательностью V_H CDR2 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 50-66 SEQ ID NO: 27.

SEQ ID NO: 30 является аминокислотной последовательностью V_H CDR3 антитела -024, включающей аминокислотные остатки 99-111 SEQ ID NO: 27.

SEQ ID NO: 31 является последовательностью CD38 человека.

SEQ ID NO: 32 является последовательностью мутантного CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина.

SEQ ID NO: 33 является последовательностью мутантного CD38 человека, где остаток глутамина в положении 272 замещен остатком аргинина.

SEQ ID NO: 34 является последовательностью мутантного CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

В настоящем изобретении предложены CD38-связывающие пептиды ("CD38BP"), которые можно применять для лечения, диагностики и предотвращения разнообразных нарушений, связанных с клетками, экспрессирующими CD38, например, множественной миеломы.

В одном варианте реализации CD38BP согласно изобретению является антителом -003. -003 является моноклональным IgG1 антителом человека, имеющим V_L участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и V_H участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

В одном варианте реализации CD38BP согласно изобретению является антителом -005. -005 является моноклональным IgG1 антителом человека, имеющим V_L участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 12, и V_H участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 17.

В одном варианте реализации CD38BP согласно изобретению является антителом -024. -024 является моноклональным IgG1 антителом человека, имеющим V_L участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 22, и V_H участок, состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 27.

Антитела взаимодействуют с антигенами мишени первично через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность участках тяжелой и легкой цепи (CDR). Из-за этого аминокислотные последовательности внутри CDR больше различаются между индивидуальными антителами, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку CDR последовательности отвечают за большую часть взаимодействий антиген-антитело, возможно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, с помощью создания экспрессирующих векторов, которые включают CDR последовательности из специфических встречающихся в природе антител, вставленные среди каркасных последовательностей другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1998), Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986), Queen et al., PNAS USA 86, 10029-10033 (1989)).

Поскольку в данной области техники хорошо известно, что CDR3 домены тяжелой цепи антитела играют особенно важную роль в специфичности/сродстве связывания антитела с антигеном (Ditzel H.J. et al., J. Immunol. 157(2), 739-49 (1996), Barbas S.M. et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 2161-2162 (1994), Barbas S.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(7), 2529-33 (1995)), CD38BP изобретения могут включать CDR3 тяжелой цепи антител -003, -005 или -024. CD38BP изобретения могут также включать CDR3 тяжелой и легкой цепи антител -003, -005 или -024. CD38BP изобретения могут далее включать CDR2 антител -003, -005 и -024 соответственно. CD38BP изобретения могут далее включать CDR1 антител -003, -005 и -024 соответственно.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которые конкурируют с -003 за связывание с CD38.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которые конкурируют с -005 за связывание с CD38.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которые конкурируют с -024 за связывание с CD38.

В одном варианте реализации конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в разделе примеров.

В одном варианте реализации конкуренцию определяют с помощью FACS, как описано в разделе примеров.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которое специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается антителами -003 или -005 или -024.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, обладающее, по существу, такими же характеристиками специфического связывания по отношению к CD38 человека, как -003 или -005 или -024.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 3.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 5.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR3, состоящий, по существу, из

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 30.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 30, и V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 28.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 30, и V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 29.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 30, V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 29, и V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 28.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, содержащее:

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, содержащее:

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, включающее:

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30.

В одном варианте реализации V_L участок и V_H участок оба находятся на одной и той же цепи пептида.

В дополнительном варианте реализации V_L участок и V_H участок разделены гибким линкером.

В одном варианте реализации V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида.

В дополнительном варианте реализации V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида скрученного белка иммуноглобулина.

В одном варианте реализации первый V_L участок и первый V_H участок ориентированы таким образом, что три CDR в V_L участке и три CDR в V_H участке кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

В дополнительном варианте реализации пептид содержит второй V_L участок, идентичный первому V_L участку, и второй V_H участок, идентичный первому V_H участку, где второй V_L участок и второй V_H участок кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, содержащее V_L участок, который является функциональным вариантом V_L участка антитела -003 или -003 или -024.

В одном варианте реализации V_L участок CD38BP состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 22 соответственно. В одном варианте реализации CD38BP обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антител -003, или -005, или -024 соответственно.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, содержащее V_H участок, который является функциональным вариантом V_H участка антитела -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации V_H участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 27 соответственно. В одном варианте реализации CD38BP обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антител -003, или -005, или -024 соответственно.

В настоящем изобретении предложено CD38BP, содержащее по меньшей мере один CDR, который

является функциональным вариантом CDR антитела -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации по меньшей мере один из CDR пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или согласно SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20, или согласно SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30 соответственно. В одном варианте реализации CD38BP обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антитела -003, или -005, или -024 соответственно.

В одном варианте реализации CD38BP обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% сродства, авидности или специфичности антитела -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации CD38BP конкурирует с -003, либо -005, либо -024 за связывание CD38. В дополнительном варианте реализации конкуренцию измеряют с помощью ELISA, как описано в разделе примеров. В другом дополнительном варианте реализации конкуренцию измеряют с помощью FACS, как описано в разделе примеров.

В одном варианте реализации CD38BP специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается антителом -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации CD38BP связывается с CD38 человека с большим сродством, чем -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации CD38BP обладает, по существу, такими же характеристиками специфического связывания CD38, как -003, или -005, или -024.

В одном варианте реализации CD38BP, по существу, не содержит других связывающих CD38 пептидов.

В одном варианте реализации настоящего изобретения CD38BP является антителом. В дополнительном варианте реализации CD38BP является антителом человека. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP является гуманизированным антителом. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP является химерным антителом.

В другом варианте реализации настоящего изобретения антитело является моноклональным антителом.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению является IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM антителом. В дополнительном варианте реализации антитело является IgG1 антителом. В дополнительном варианте реализации антитело является IgG1,κ антителом. В другом дополнительном варианте реализации антитело является IgM антителом. В другом дополнительном варианте реализации антитело является IgM,κ антителом.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению является фрагментом антитела или одноцепочечным антителом.

В одном варианте реализации CD38BP гликозилировано в эукариотической клетке.

В одном варианте реализации CD38BP дополнительно содержит линкер хелатор для присоединения радиоизотопа.

В одном варианте реализации CD38BP находится, по существу, в выделенной форме.

В настоящем изобретении представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая CD38BP согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении представлен экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD38BP согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации экспрессирующий вектор содержит V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 и V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

В одном варианте реализации экспрессирующий вектор содержит V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 11 и V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16.

В одном варианте реализации экспрессирующий вектор содержит V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 21, V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 26 или

В настоящем изобретении предложена трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, содержащее переменные участки легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, которые содержат переменную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 12 или консервативные модификации этой последовательности и переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 17 или консервативные модификации этой последовательности. В одном варианте реализации легкая цепь человека содержит переменную аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и тяжелая цепь человека содержит переменную аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 17.

В настоящем изобретении предложена гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидную последовательность в переменном участке легкой цепи согласно SEQ ID NO: 21 или консервативные модификации этой последовательности и нуклеотидную последовательность в переменном участке тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 26 или консервативные модификации этой последовательности. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота легкой цепи человека содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 21 и нуклеиновая кислота тяжелой цепи человека содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 26.

В настоящем изобретении предложена гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, содержащее переменные участки тяжелой цепи человека и легкой цепи человека, которые содержат переменную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 22 или консервативные модификации этой последовательности и переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 27 или консервативные модификации этой последовательности. В одном варианте реализации переменный участок легкой цепи человека содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и переменный участок тяжелой цепи человека содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27.

В настоящем изобретении предложена трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами переменного участка легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 21 или консервативными модификациями этой последовательности и нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 26 или консервативными модификациями этой последовательности. В одном варианте реализации моноклональное анти-CD38 антитело человека кодируется нуклеиновыми кислотами переменного участка легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 21 и нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 26.

В настоящем изобретении предложена трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, содержащее переменные участки легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, которые содержат переменную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 22 или консервативные модификации этой последовательности и переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 27 или консервативные модификации этой последовательности. В одном варианте реализации легкая цепь человека содержит переменную аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и тяжелая цепь человека содержит переменную аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27.

В настоящем изобретении предложена эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, которая продуцирует CD38BP согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложена эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор, согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложено трансгенное животное, отличное от человека, или растение, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь человека и легкую цепь человека, где животное или растение продуцирует детектируемое количество CD38BP согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложен иммуноконъюгат, включающий CD38BP согласно настоящему изобретению, соединенный с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарством. В одном варианте реализации пептид является мономерным IgM антителом, соединенным с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарством.

В настоящем изобретении предложена биспецифичная или мультиспецифичная молекула, включающая CD38BP согласно настоящему изобретению, и обладающая специфичностью связывания в отношении эффекторной клетки человека. В одном варианте реализации специфичность связывания в отношении эффекторной клетки человека является специфичностью связывания в отношении CD3, CD4, CD138, IL-15R, мембрано-связанного или связанного с рецептором TFN- α , Fc рецептором человека или мембрано-связанного или связанного с рецептором IL-15.

В настоящем изобретении предложено антиидиотипическое антитело, связывающееся с CD38BP согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложено применение антиидиотипического антитела согласно настоящему изобретению для детектирования уровня моноклонального антитела человека против CD38 в образце.

Далее перечислены отдельные варианты реализации настоящего изобретения.

Вариант реализации 1: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, соответственно, или консервативные модификации их последовательности.

Вариант реализации 2: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

Вариант реализации 3: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 16, соответственно, или консервативные модификации их последовательности.

Вариант реализации 4: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 16 соответственно.

Вариант реализации 5: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 26, соответственно, или консервативные модификации их последовательности.

Вариант реализации 6: антитело, связывающееся с CD38 человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных участках согласно SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

Вариант реализации 7: пептид, который конкурирует с антителом согласно варианту реализации 2 за связывание с CD38.

Вариант реализации 8: пептид согласно варианту реализации 7, где конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в примере 8 или 9 изобретения.

Вариант реализации 9: пептид согласно варианту реализации 7, где конкуренцию определяют с помощью измерения перекрестного блокирования, как описано в примере 7 изобретения.

Вариант реализации 10: пептид, который специфически связывается с эпитопом CD38, где эпитоп также специфически связывается антителом согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 11: пептид, обладающий, по существу, такими же характеристиками специфического связывания для связывания CD38 человека, как антитело согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 12: пептид, содержащий V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 3.

Вариант реализации 13: пептид, содержащий V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 4.

Вариант реализации 14: пептид, содержащий V_L CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 5.

Вариант реализации 15: пептид согласно варианту реализации 14, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 3.

Вариант реализации 16: пептид согласно варианту реализации 14, где пептид содержит также V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 4.

Вариант реализации 17: пептид согласно варианту реализации 16, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 3.

Вариант реализации 18: пептид, содержащий V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации 19: пептид, содержащий V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 9.

Вариант реализации 20: пептид, содержащий V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 10.

Вариант реализации 21: пептид согласно варианту реализации 20, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации 22: пептид согласно варианту реализации 20, где пептид содержит также V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 9.

Вариант реализации 23: пептид согласно варианту реализации 22, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации 24: пептид, содержащий

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

Вариант реализации 25: пептид согласно варианту реализации 24, где V_L участок и V_H участок оба находятся на одной и той же цепи пептида.

Вариант реализации 26: пептид согласно варианту реализации 24, где V_L участок и V_H участок разделены гибким линкером.

Вариант реализации 27: пептид согласно варианту реализации 24, где V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида.

Вариант реализации 28: пептид согласно варианту реализации 24, где V_L участок и V_H участок на-

ходятся на разных цепях пептида в скрученном белке иммуноглобулина.

Вариант реализации 29: пептид согласно вариантам реализации 24-28, где первый V_L участок и первый V_H участок ориентированы таким образом, что три CDR в V_L участке и три CDR в V_H участке кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 30: пептид согласно варианту реализации 29, где пептид содержит второй V_L участок, идентичный первому V_L участку и второй V_H участок, идентичный первому V_H участку, где второй V_L участок и второй V_H участок кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 31: пептид, содержащий V_L участок, который является функциональным вариантом V_L участка антитела согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 32: пептид согласно варианту реализации 31, где V_L участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

Вариант реализации 33: пептид, содержащий V_H участок, который является функциональным вариантом V_H участка антитела согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 34: пептид согласно варианту реализации 33, где V_H участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

Вариант реализации 35: пептид, содержащий по меньшей мере один CDR, являющийся функциональным вариантом CDR антитела согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 36: пептид согласно варианту реализации 35, где по меньшей мере один CDR пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

Вариант реализации 37: пептид согласно любому варианту реализации от 31 до 36, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антитела согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 38: пептид согласно любому варианту реализации от 31 до 36, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% сродства, авидности или специфичности антитела согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 39: пептид согласно любому варианту реализации от 12 до 38, где пептид специфически связывает CD38 человека.

Вариант реализации 40: пептид согласно любому варианту реализации от 12 до 39, где пептид конкурирует с антителом согласно варианту реализации 2 за связывание CD38.

Вариант реализации 41: пептид согласно варианту реализации 40, где конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в примере 8 или 9 изобретения.

Вариант реализации 42: пептид согласно варианту реализации 7, где конкуренцию определяют с помощью определения перекрестной блокировки, как описано в примере 7 изобретения.

Вариант реализации 43: пептид согласно варианту реализации 39, где пептид специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается с антителом согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 44: пептид согласно любому варианту реализации от 39 до 43, где пептид связывается с CD38 человека с большим сродством, чем антитело согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 45: пептид согласно любому варианту реализации от 39 до 43, где пептид обладает, по существу, такими же характеристиками специфического связывания CD38, как антитело согласно варианту реализации 2.

Вариант реализации 46: пептид согласно любому варианту реализации от 39 до 45, где пептид, связывающий CD38, по существу, не содержит других пептидов, связывающих CD38.

ческого связывания CD38, как антитело согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 68: пептид, содержащий V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 13.

Вариант реализации 69: пептид, содержащий V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 14.

Вариант реализации 70: пептид, содержащий V_L CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 15.

Вариант реализации 71: пептид согласно варианту реализации 70, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 13.

Вариант реализации 72: пептид согласно варианту реализации 70, где пептид содержит также V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 14.

Вариант реализации 73: пептид согласно варианту реализации 72, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 13.

Вариант реализации 74: пептид, содержащий V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 18.

Вариант реализации 75: пептид, содержащий V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 19.

Вариант реализации 76: пептид, содержащий V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 20.

Вариант реализации 77: пептид согласно варианту реализации 76, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 18.

Вариант реализации 78: пептид согласно варианту реализации 76, где пептид содержит также V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 19.

Вариант реализации 79: пептид согласно варианту реализации 78, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 18.

Вариант реализации 80: пептид, содержащий

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20.

Вариант реализации 81: пептид согласно варианту реализации 80, где V_L участок и V_H участок, оба, находятся на одной и той же цепи пептида.

Вариант реализации 82: пептид согласно варианту реализации 81, где V_L участок и V_H участок разделены гибким линкером.

Вариант реализации 83: пептид согласно варианту реализации 80, где V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида.

Вариант реализации 84: пептид согласно варианту реализации 83, где V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида в скрученном белке иммуноглобулина.

Вариант реализации 85: пептид согласно вариантам реализации 80-84, где первый V_L участок и первый V_H участок ориентированы таким образом, что три CDR в V_L участке и три CDR в V_H участке кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 86: пептид согласно варианту реализации 85, где пептид содержит второй V_L участок идентичный первому V_L участку и второй V_H участок идентичный первому V_H участку, где второй V_L участок и второй V_H участок кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 87: пептид, содержащий V_L участок, который является функциональным вариантом V_L участка антитела согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 88: пептид согласно варианту реализации 87, где V_L участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 12.

Вариант реализации 89: пептид, содержащий V_H участок, который является функциональным вариантом V_H участка антитела согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 90: пептид согласно варианту реализации 89, где V_H участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 17.

Вариант реализации 91: пептид, содержащий по меньшей мере один из CDR, являющийся функциональным вариантом CDR антитела согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 92: пептид согласно варианту реализации 91, где по меньшей мере один из CDR пептида состоит по существу из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по

меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20.

Вариант реализации 93: пептид согласно любому варианту реализации от 87 до 92, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антитела согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 94: пептид согласно любому варианту реализации от 87 до 92, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% сродства, авидности или специфичности антитела согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 95: пептид согласно любому варианту реализации от 68 до 94, где пептид специфически связывает CD38 человека.

Вариант реализации 96: пептид согласно любому варианту реализации от 68 до 95, где пептид конкурирует с антителом согласно варианту реализации 4 за связывание CD38.

Вариант реализации 97: пептид согласно варианту реализации 96, где конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в примере 8 или 9 изобретения.

Вариант реализации 98: пептид согласно варианту реализации 96, где конкуренцию определяют с помощью определения перекрестного блокирования, как описано в примере 7 изобретения.

Вариант реализации 99: пептид согласно варианту реализации 95, где пептид специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается антителом согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 100: пептид согласно любому варианту реализации от 95 до 99, где пептид связывается с CD38 человека с большим сродством, чем антитело согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 101: пептид согласно любому варианту реализации от 95 до 99, где пептид обладает, по существу, такими же характеристиками специфического связывания CD38, как антитело согласно варианту реализации 4.

Вариант реализации 102: пептид согласно любому варианту реализации от 95 до 101, где пептид, связывающий CD38, по существу, не содержит других пептидов, связывающих CD38.

Вариант реализации 103: пептид, согласно любому варианту реализации от 63 до 102, который связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31) и не связывается с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34) в той же степени, как он связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 104: пептид согласно варианту реализации 103, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 105: пептид согласно варианту реализации 104, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 10% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 106: пептид согласно варианту реализации 105, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 5% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 107: пептид согласно варианту реализации 106, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 1% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 108: пептид, который связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31), и не связывается с мутантным CD38 человека, где остаток глутамин в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33) в той же степени, как он связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 109: пептид согласно варианту реализации 108, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 110: пептид согласно варианту реализации 109, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 10% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 111: пептид согласно любому варианту реализации от 103 до 107, который не связывается с мутантным CD38 человека, где остаток глутамин в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33) в той же степени, как он связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 112: пептид согласно варианту реализации 111, где EC_{50} для связывания пеп-

тида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 113: пептид согласно варианту реализации 112, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 10% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 114: пептид согласно любому варианту реализации от 103 до 113, где упомянутый пептид связывается с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32) в той же степени, как он связывается с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 115: пептид согласно варианту реализации 114, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 75% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 116: пептид согласно варианту реализации 115, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 85% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 117: пептид согласно варианту реализации 116, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 90% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 118: пептид согласно варианту реализации 117, где EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 95% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Вариант реализации 119: пептид, который конкурирует с антителом согласно варианту реализации 6 за связывание CD38.

Вариант реализации 120: пептид согласно варианту реализации 119, где конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в примере 8 или 9 изобретения.

Вариант реализации 121: пептид согласно варианту реализации 119, где конкуренцию определяют с помощью определения перекрестного блокирования, как описано в примере 7 изобретения.

Вариант реализации 122: пептид, который специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается антителом согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 123: пептид, обладающий, по существу, такими же характеристиками специфического связывания CD38, как антитело согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 124: пептид, содержащий V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 23.

Вариант реализации 125: пептид, содержащий V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 24.

Вариант реализации 126: пептид, содержащий V_L CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 25.

Вариант реализации 127: пептид согласно варианту реализации 126, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 23.

Вариант реализации 128: пептид согласно варианту реализации 126, где пептид содержит также V_L CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 24.

Вариант реализации 129: пептид согласно варианту реализации 128, где пептид содержит также V_L CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 23.

Вариант реализации 130: пептид, содержащий V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 28.

Вариант реализации 131: пептид, содержащий V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 29.

Вариант реализации 132: пептид, содержащий V_H CDR3, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 30.

Вариант реализации 133: пептид согласно варианту реализации 132, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 28.

Вариант реализации 134: пептид согласно варианту реализации 132, где пептид содержит также V_H CDR2, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 29.

Вариант реализации 135: пептид согласно варианту реализации 134, где пептид содержит также V_H CDR1, состоящий, по существу, из SEQ ID NO: 28.

Вариант реализации 136: пептид, содержащий

(а) первый V_L участок, содержащий три V_L CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, и

(б) первый V_H участок, содержащий три V_H CDR, которые независимо друг от друга состоят, по существу, из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30.

Вариант реализации 137: пептид согласно варианту реализации 136, где V_L участок и V_H участок оба находятся на одной и той же цепи пептида.

Вариант реализации 138: пептид согласно варианту реализации 137, где V_L участок и V_H участок разделены гибким линкером.

Вариант реализации 139: пептид согласно варианту реализации 136, где V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида.

Вариант реализации 140: пептид согласно варианту реализации 139, где V_L участок и V_H участок находятся на разных цепях пептида в скрученном белке иммуноглобулина.

Вариант реализации 141: пептид согласно вариантам реализации 136-140, где первый V_L участок и первый V_H участок ориентированы таким образом, что три CDR в V_L участке и три CDR в V_H участке кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 142: пептид согласно варианту реализации 141, где пептид содержит второй V_L участок, идентичный первому V_L участку, и второй V_H участок, идентичный первому V_H участку, где второй V_L участок и второй V_H участок кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты CD38 человека.

Вариант реализации 143: пептид, содержащий V_L участок, который является функциональным вариантом V_L участка антитела согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 144: пептид согласно варианту реализации 143, где V_L участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 22.

Вариант реализации 145: пептид, содержащий V_H участок, который является функциональным вариантом V_H участка антитела согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 146: пептид согласно варианту реализации 145, где V_H участок пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 27.

Вариант реализации 147: пептид, содержащий по меньшей мере один CDR, являющийся функциональным вариантом CDR антитела согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 148: пептид согласно варианту реализации 147, где по меньшей мере один CDR пептида состоит, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

Вариант реализации 149: пептид согласно любому варианту реализации от 143 до 148, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% эпитоп-связывающих характеристик антитела согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 150: пептид согласно любому варианту реализации от 143 до 148, где пептид обладает по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% сродства, авидности или специфичности антитела согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 151: пептид согласно любому варианту реализации от 124 до 150, где пептид специфически связывает CD38 человека.

Вариант реализации 152: пептид согласно любому варианту реализации от 124 до 151, где пептид конкурирует с антителом согласно варианту реализации 6 за связывание CD38.

Вариант реализации 153: пептид согласно варианту реализации 152, где конкуренцию определяют с помощью ELISA, как описано в примере 8 или 9 изобретения.

Вариант реализации 154: пептид согласно варианту реализации 152, где конкуренцию определяют с

помощью определения перекрестного блокирования, как описано в примере 7 изобретения.

Вариант реализации 155: пептид согласно варианту реализации 151, где пептид специфически связывается с эпитопом CD38, причем эпитоп также специфически связывается антителом согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 156: пептид согласно любому варианту реализации от 151 до 155, где пептид связывается с CD38 человека с большим сродством, чем антитело согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 157: пептид согласно любому варианту реализации от 151 до 155, где пептид обладает, по существу, такими же характеристиками специфического связывания CD38, как антитело согласно варианту реализации 6.

Вариант реализации 158: пептид согласно любому варианту реализации от 151 до 157, где пептид, связывающий CD38, по существу, не содержит других пептидов, связывающих CD38.

Вариант реализации 159: пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 158, где пептид не является агонистом CD38.

Вариант реализации 160: пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 159, где пептид не индуцирует значительную пролиферацию моноклеарных клеток периферической крови.

Вариант реализации 161: пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 160, где пептид не индуцирует высвобождение значительных уровней IL-6 моноцитами человека или моноклеарными клетками периферической крови.

Вариант реализации 162: пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 161, где пептид не индуцирует высвобождение детектируемых уровней IFN- γ Т-клетками человека или моноклеарными клетками периферической крови.

Вариант реализации 163: пептид согласно любому варианту реализации от 7 до 162, где пептид является антителом.

Вариант реализации 164: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или 163, где антитело является антителом человека.

Вариант реализации 165: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или 163, где антитело является гуманизированным антителом.

Вариант реализации 166: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или 163, где антитело является химерным антителом.

Вариант реализации 167: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или 163-166, где антитело является моноклональным антителом.

Вариант реализации 168: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или 163-167, характеризующееся тем, что оно является IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM антителом.

Вариант реализации 169: антитело согласно варианту реализации 168, характеризующееся тем, что оно является IgG1 антителом.

Вариант реализации 170: антитело согласно варианту реализации 169, характеризующееся тем, что оно является IgG1,к антителом.

Вариант реализации 171: антитело согласно варианту реализации 168, характеризующееся тем, что оно является IgM антителом.

Вариант реализации 172: антитело согласно варианту реализации 171, характеризующееся тем, что оно является IgM,к антителом.

Вариант реализации 173: пептид согласно любому варианту реализации от 2 до 172, где пептид гликозилирован в эукариотической клетке.

Вариант реализации 174: антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 6 или от 163 до 173, которое является фрагментом антитела или одноцепочечным антителом.

Вариант реализации 175: пептид или антитело согласно любому варианту реализации от 1 до 174, далее включающие линкер хелатор для присоединения радиоизотопа.

Вариант реализации 176: пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175, который, по существу, является выделенным.

Вариант реализации 177: выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175.

Вариант реализации 178: экспрессирующий вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175.

Вариант реализации 179: экспрессирующий вектор, включающий V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 и V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации 180: экспрессирующий вектор, включающий V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 11 и V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16.

Вариант реализации 181: экспрессирующий вектор, согласно варианту реализации 179 или 180, далее включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок легкой цепи, тяжелой цепи или обеих легкой и тяжелой цепей антитела человека.

Вариант реализации 182: экспрессирующий вектор, согласно варианту реализации 181, где нуклеотидная последовательность, кодирующая константный участок легкой цепи, тяжелой цепи или обеих легкой и тяжелой цепи антитела человека, кодирует IgG1 антитело.

Вариант реализации 183: гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, включающими нуклеотидные последовательности в варибельном участке легкой цепи согласно SEQ ID NO: 1 или консервативные модификации этих последовательностей и нуклеотидные последовательности в варибельном участке тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 6 или консервативные модификации этих последовательностей.

Вариант реализации 184: гибридома, согласно варианту реализации 183, где нуклеиновые кислоты легкой цепи человека включают нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 и нуклеиновые кислоты тяжелой цепи человека включают нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации 185: гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, включающее вариабельные участки тяжелой цепи человека и легкой цепи человека, которые включают вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 2, или консервативные модификации этой последовательности и вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7, или консервативные модификации этой последовательности.

Вариант реализации 186: гибридома согласно варианту реализации 185, где переменный участок легкой цепи человека включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 и переменный участок тяжелой цепи человека включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7.

Вариант реализации 187: трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека SEQ ID NO: 1 или консервативными модификациями этих последовательностей и нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:6 или консервативными модификациями этих последовательностей.

Вариант реализации 188: трансфектома согласно варианту реализации 187, моноклональное анти-CD38 антитело человека кодируется нуклеиновой кислотой вариabельного участка легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 1 и нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации 189: трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, включающее переменные участки легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, которые включают переменную аминокислотную последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 2 или консервативные модификации этой последовательности и переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 или консервативные модификации этой последовательности.

Вариант реализации 190: трансфектома согласно варианту реализации 189, где легкая цепь человека включает вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 2 и тяжелая цепь человека включает вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7.

Вариант реализации 191: гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, включающими нуклеотидные последовательности в варибельном участке легкой цепи согласно SEQ ID NO: 11 или консервативные модификации этих последовательностей и нуклеотидные последовательности в варибельном участке тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 16 или консервативные модификации этих последовательностей.

Вариант реализации 192: гибридома согласно варианту реализации 191, где нуклеиновые кислоты легкой цепи человека включают нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, нуклеиновые кислоты тяжелой цепи человека включают нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16.

Вариант реализации 193: гибридома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, включающее вариабельные участки тяжелой цепи человека и легкой цепи человека, которые включают вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 12 или консервативные модификации этой последовательности и вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 17 или консервативные модификации этой последовательности.

Вариант реализации 194: гибридома согласно варианту реализации 193, где варибельный участок легкой цепи человека включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и варибельный участок тяжелой цепи человека включает аминокислотную последовательность согласно SEQ

ID NO: 17.

Вариант реализации 195: трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, кодируемое нуклеиновыми кислотами переменного участка легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 11 или консервативными модификациями этих последовательностей и нуклеотидными последовательностями тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 16 или консервативными модификациями этих последовательностей.

Вариант реализации 196: трансфектома согласно варианту реализации 195, где моноклональное анти-CD38 антитело человека кодируется нуклеиновыми кислотами переменного участка легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 11 и нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 16.

Вариант реализации 197: трансфектома, которая продуцирует моноклональное анти-CD38 антитело человека, включающее переменные участки легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, которые включают переменную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 12 или консервативные модификации этой последовательности и переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 17 или консервативные модификации этой последовательности.

Вариант реализации 198: трансфектома согласно варианту реализации 197, где легкая цепь человека включает переменную аминокислотную последовательность легкой цепи человека согласно SEQ ID NO: 12 и тяжелая цепь человека включает переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека согласно SEQ ID NO: 17.

Вариант реализации 199: эукариотическая или прокариотическая клетка хозяина, которая продуцирует пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175.

Вариант реализации 200: эукариотическая или прокариотическая клетка хозяина, содержащая экспрессирующий вектор согласно варианту реализации 178.

Вариант реализации 201: трансгенное животное, отличное от человека, или растение, включающие нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь человека и легкую цепь человека, где животное или растение продуцирует детектируемое количество пептида согласно любому варианту реализации от 1 до 175.

Вариант реализации 202: иммуноконъюгат, включающий пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 174, соединенный с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарством.

Вариант реализации 203: иммуноконъюгат, включающий пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 168 или от 171 до 174, где пептид является мономерным IgM антителом, соединенным с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарством.

Вариант реализации 204: биспецифичная или мультиспецифичная молекула, включающая пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175, и специфичность связывания эффекторной клетки человека.

Вариант реализации 205: биспецифичная или мультиспецифичная молекула, включающая пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 175, и специфичность связывания CD3, CD4, IL-15R, мембрано-связанного или связанного с рецептором TFN- α , Fc рецептором человека или мембрано-связанного или связанного с рецептором IL-15.

Вариант реализации 206: фармацевтическая композиция, включающая пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 176 или иммуноконъюгат согласно любому варианту реализации от 202 до 205 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант реализации 207: фармацевтическая композиция согласно варианту реализации 206, включающая один или более дополнительных терапевтических агентов.

Вариант реализации 208: способ ингибирования роста и/или пролиферации клеток, экспрессирующих CD38, включающий применение пептида согласно любому варианту реализации от 1 до 176, иммуноконъюгата согласно любому варианту реализации от 202 до 205, фармацевтической композиции согласно варианту реализации 206 или 207 или экспрессирующего вектора согласно любому варианту реализации от 178 до 182, так что рост и/или пролиферация клеток ингибируется.

Вариант реализации 209: способ лечения заболевания или нарушения, вовлекающего клетки, экспрессирующие CD38, где этот способ включает применение/введение пептида согласно любому варианту реализации от 1 до 176, иммуноконъюгата согласно любому варианту реализации от 202 до 205, фармацевтической композиции согласно варианту реализации 206 или 207 или экспрессирующего вектора согласно любому варианту реализации от 178 до 182 субъекту, который в них нуждается.

Вариант реализации 210: способ предотвращения заболевания или нарушения, вовлекающего клетки, экспрессирующие CD38 у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества пептида согласно любому варианту реализации от 1 до 176, иммуноконъюгата согласно любому варианту реализации от 202 до 205, фармацевтической композиции согласно варианту реализации 206 или 207 или экспрессирующего вектора согласно любому варианту реализации от 178 до 182 субъекту, который в них нуждается.

Вариант реализации 211: способ согласно варианту реализации 209 или 210, где заболевание или

нарушение является ревматоидным артритом.

Вариант реализации 212: способ согласно варианту реализации 209 или 210, где заболевание или нарушение является множественной миеломой.

Вариант реализации 213: способ согласно любому варианту реализации от 209 до 212, где способ включает введение одного или более дополнительного терапевтического агента субъекту.

Вариант реализации 214: способ согласно варианту реализации 213, где дополнительные один или более терапевтических агентов выбирают из химиотерапевтического агента, противовоспалительного агента, иммуносупрессивного и/или иммуномодуляторного агента.

Вариант реализации 215: способ согласно варианту реализации 213, где дополнительные один или более терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из цисплатина, гефитиниба, цетуксимаба, ритуксимаба, бевацизумаба, эрлотиниба, бортезомиба, талидомида, памидроната, золедроновой кислоты, клодроната, ризендроната, ибандроната, этидроната, алендроната, тилудроната, триоксид мышьяка, леналидомида, филграстима, пегфилграстима, зарграмостима, субероиланилид гидроксамовой кислоты и SCIO-469.

Вариант реализации 216: *in vitro* способ для детектирования наличия CD38 антигена или клеток, экспрессирующих CD38, в образце, включающий:

А) контактирование образца с пептидом согласно любому варианту реализации от 1 до 176 в условиях, позволяющих образование комплекса между пептидом и CD38, и

Б) детектирование образования этого комплекса.

Вариант реализации 217: *in vitro* способ согласно варианту реализации 216, где упомянутый пептид является антителом.

Вариант реализации 218: набор для детектирования наличия CD38 антигена или клеток, экспрессирующих CD38, в образце, включающий пептид согласно любому варианту реализации от 1 до 176.

Вариант реализации 219: *in vivo* способ для детектирования CD38 антигена или клеток, экспрессирующих CD38 у субъекта, включающий:

а) введение пептида согласно любому варианту реализации от 1 до 176 в условиях, позволяющих образование комплекса между пептидом и CD38, и

б) детектирование образованного комплекса.

Вариант реализации 220: *in vitro* способ согласно варианту реализации 219, где упомянутый пептид является антителом.

Вариант реализации 221: антиидиотипическое антитело, связывающееся с пептидом согласно любому варианту реализации 2, 4 или от 163 до 174.

Вариант реализации 222: применение антиидиотипического антитела согласно варианту реализации 221 для детектирования уровня пептида согласно любому варианту реализации 2, 4 или от 163 до 174 в образце.

Вариант реализации 223: применение антиидиотипического антитела согласно варианту реализации 221 для детектирования уровня моноклонального антитела человека против CD38 в образце.

Термины "CD38" и "антиген CD38" применяются в настоящей заявке взаимозаменяемо и включают любые варианты, изоформы и виды гомологов CD38 человека, которые естественным образом экспрессируются клетками, трансфицированными геном CD38. Синонимы CD38, как принято в данной области техники, включают АДФ-рибозил-циклазу 1, αАДФ-гидролазу 1, CD38-rs1, гидролазу 1 циклической АДФ-рибозы, I-19, NIM-R5 антиген.

Термин "пептид" по отношению как к CD38-связывающим пептидам, так и не-CD38 пептидам, описанным в настоящей заявке, включает любой подходящий пептид и может применяться как синоним терминам "полипептид" и "белок", если не отмечено обратное или это не противоречит контексту; при условии, что читатель понимает, что каждый тип соответствующей молекулы, содержащей аминокислотный полимер, может быть связан с существенными различиями. и таким образом образует отдельный вариант реализации настоящего изобретения (например, такой пептид, как антитело, которое состоит из нескольких полипептидных цепей, значительно отличается, например, от одноцепочечного антитела, пептидного иммуноадгезина или одноцепочечного иммуногенного пептида). Поэтому термин "пептид" в настоящей заявке следует, по существу, понимать как относящийся к любому подходящему пептиду любого подходящего размера или состава (с точки зрения количества аминокислот и числа объединенных цепей в молекуле белка). Далее пептиды в контексте способов и композиций изобретения, описанных в настоящей заявке, могут включать не встречающиеся в природе и/или не-L-аминокислотные остатки, если не отмечено обратное или это не противоречит контексту.

Как будет обсуждаться далее, если не отмечено обратное или это не противоречит контексту, термин пептид (и если обсуждать отдельные варианты термина, полипептид и/или белок) также охватывает дериватизированные молекулы пептида. Вкратце, в контексте данного изобретения производное (дериват) является пептидом, у которого один или более аминокислотный остаток химически модифицирован (например, посредством алкилирования, ацилирования, образования сложного эфира, образования амида) или связан с одним или более неаминокислотным органическим и/или неорганическим атомным или молекулярным заместителем (например, группой полиэтиленгликоля (ПЭГ), липофильным заместителем

(который при необходимости может быть связан с аминокислотной последовательностью пептида через разделительный остаток или группу, такую как β -аланин, γ -аминобутировую кислоту (ГАБК), L/D-глутаминовую кислоту, янтарную кислоту и т.п.) флуорофором, биотином, радиоизотопом и т.д. и может также или альтернативно включать неосновные, неприродного происхождения и/или не-L аминокислотные остатки, если не отмечено обратное или это не противоречит контексту (однако опять следует понимать, что такие производные могут рассматриваться как независимые свойства настоящего изобретения и включение таких молекул в понятие пептида сделано ради удобства описания настоящего изобретения, скорее чем для введения какого-то ни было равенства между голыми пептидами и такими производными). Неограничивающие примеры таких аминокислотных остатков включают, например, 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, β -аланин, β -аминопропионовую кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, 3-гидроксипролин, 4-гидрокпролин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизольцин, 6-N-метиллизин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, орнитин и статин, галогенированные аминокислоты.

"Антиген-связывающий пептид" относится к любому пептиду, который специфически связывается с частью данного антигена в клеточных и/или физиологических условиях в течение времени, достаточно-го, чтобы индуцировать, ускорить, усилить и/или другим способом модулировать физиологическое действие, связанное с антигеном; чтобы позволить детекцию с помощью ELISA, блоттинга (Western blot) или других сходных применимых техник исследования связывания белков, описанных в настоящей заявке и/или известных в данной области техники, и/или быть связанным с ним другим детектируемым способом в течение соответствующего времени (например, по меньшей мере приблизительно 15 мин, по меньшей мере приблизительно 30 мин, по меньшей мере приблизительно 45 мин, по меньшей мере приблизительно 1 ч, по меньшей мере приблизительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 4 ч, по меньшей мере приблизительно 6 ч, по меньшей мере приблизительно 12 ч, приблизительно 1-12 ч, приблизительно 1-36 ч, приблизительно 1-48 ч, приблизительно 1-72 ч, приблизительно одной недели или дольше).

CD38-связывающий пептид, или CD38BP, является пептидом, связывающим антиген, который специфически связывается с антигеном CD38. В одном варианте реализации связывание CD38BP с CD38 измеряют с помощью способа, описанного в примере 4.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеидов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей с низким молекулярным весом и одной пары тяжелых (H) цепей, где все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* ch. 7 (Paul W. Ed. 2nd ed., Raven Press, NY (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из варибельного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначенного в настоящей заявке как V_H) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь обычно состоит из варибельного участка легкой цепи (сокращенно обозначенного в настоящей заявке как V_L) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи обычно состоит из одного домена C_L . Участки V_H и V_L можно далее подразделить на участки гиперварибельности (или гиперварибельные участки, которые могут быть гиперварибельными по последовательности и/или форме задаваемых структурой петель), называемые также участками, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR).

Каждый V_H и V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk, L. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Обычно нумерацию аминокислотных остатков в этом участке проводят по способу, описанному в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991) (такие фразы, как нумерация остатков варибельного участка, как у Кабата или по Кабату, относится в настоящей заявке к такой системе нумерации варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи). При применении этой системы нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты в соответствии с укорочением или вставками в FR или CDR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать вставку из единичной аминокислоты (остаток 52a согласно Кабату) после остатка 52 в V_H CDR2 и вставленные остатки (например, 82a, 82b и 82в и т.д. согласно Кабату) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кабату можно определить для данного антитела посредством сопоставления (выравнивания) участков гомологии последовательности со "стандартной" пронумерованной последовательностью Кабата.

Термин антитело (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобули-

на, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которая обладает способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях в течение значительных периодов времени, таких как по меньшей мере приблизительно 30 мин, по меньшей мере приблизительно 45 мин, по меньшей мере приблизительно 1 ч, по меньшей мере приблизительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 4 ч, по меньшей мере приблизительно 8 ч, по меньшей мере приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч или более, приблизительно 48 ч или более, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д. или любого другого соответствующего определенного функционального периода (такого как время, достаточное для того, чтобы индуцировать, ускорить, усилить и/или модулировать физиологический ответ, вызванный связыванием антитела с антигеном).

Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константные участки антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включающими различные клетки иммунной системы (такими как эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Анти-CD38 антитело может быть биспецифичным антителом, диателом или сходными молекулами (см., например, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) для описания диател). Действительно, биспецифичные антитела, диатела и т.п., предоставленные настоящим изобретением, могут связывать любую подходящую мишень в придачу к части CD38.

Как отмечено выше, термин антитело в настоящей заявке, если не отмечено обратное или это не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Показано, что антиген-связывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченные термином "антитело", включают (1) Fab фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (2) $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$ фрагменты, двухвалентные фрагменты, включающие два Fab фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в участке связки; (3) Fd фрагмент, состоящий, по существу, из V_H и C_{H1} доменов; (4) Fv фрагмент, состоящий, по существу, из V_L и V_H доменов одной руки антитела; (5) dAb фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит, по существу, из V_H домена; (6) изолированный участок, определяющий комплементарность (CDR); и (7) сочетание двух или более изолированных CDR, которые при необходимости могут быть соединены синтетическим линкером. Далее хотя два домена Fv фрагмента, V_L и V_H кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных методов посредством синтетического линкера, который позволяет получать их в виде единой цепи белка, в котором V_L и V_H участки образуют пару для образования одновалентных молекул (известных, как одноцепочечные антитела или одноцепочечное Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело, если не отмечено обратное или это не противоречит контексту. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, включены в термин антитело. Хотя такие фрагменты, по существу, включены в термин антитело, они все вместе и каждое отдельно являются уникальными свойствами настоящего изобретения, проявляя различные биологические свойства и применения. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения обсуждаются далее.

Также следует понимать, что термин антитело также, по существу, включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAbs), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, антиидиотипические (anti-Id) антитела к антителам и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антиген-связывающие фрагменты), предоставленные любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные техники. Полученные антитела могут обладать любым изотипом.

Анти-CD38 антитело является антителом, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном CD38.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активной поверхностной группировки молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, прямо участвующие в связывании (называемые также иммунодоминантным компонентом эпитопа) и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфически антиген-связывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток расположен внутри отпечатка (footprint) специфичного антиген-связывающего пептида).

Термин "биспецифичная молекула" включает любой агент, такой как белок, пептид или комплекс белка или пептида, который обладает двумя разными специфичностями связывания. Например, молекула может связываться с или реагировать с (а) антигеном клеточной поверхности, (б) Fc рецептором на по-

верхности эффекторной клетки. Термин "мультиспецифичная молекула" включает любой агент, такой как белок, пептид или комплекс белка или пептида, который обладает более чем двумя разными специфичностями связывания. Например, молекула может связываться с или реагировать с (а) антигеном клеточной поверхности и (б) Fc рецептором на поверхности эффекторной клетки и (в) по меньшей мере еще одним компонентом. Соответственно, настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, биспецифичные, триспецифичные, тетраспецифичные и другие мультиспецифичные молекулы, направленные на CD38 и на другие антигены или мишени клеточной поверхности, такие как Fc рецепторы на эффекторных клетках.

Термин "биспецифичные антитела" включает любое анти-CD38 антитело, которое является биспецифичной молекулой. Термин "биспецифичные антитела" также включает диатела. Диатела являются двухвалентными биспецифичными антителами, у которых V_H и V_L домены экспрессированы на одной полипептидной цепи, но с применением линкера, который слишком короток, чтобы позволить образование пары между двумя доменами одной и той же цепи, заставляя, таким образом, домены образовывать пары с комплементарными домерами другой цепи с образованием двух антиген-связывающих участков (см., например, Holliger et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), Poljak RJ et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)).

Как применяется в настоящей заявке, термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в противоположность когнитивной и фазе активации иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают клетку миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоцит (такой как В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-убийцы, природные клетки-убийцы, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, полиморфоядерные клетки, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В ряде вариантов реализации эффекторная клетка способна индуцировать зависимую от антитела клеточную цитотоксичность (ADCC), как, например, нейтрофил способен индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, экспрессирующие FcR, участвуют в специфическом киллинге клеток мишени и презентации антигенов для других компонентов иммунной системы или связывании с клетками, которые несут антигены. В некоторых вариантах реализации эффекторная клетка может фагоцитировать антиген мишени, клетку мишени или микроорганизм. Экспрессия отдельного FcR эффекторной клеткой может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Например, обнаружено, что экспрессия FcγRI регулируется на повышение интерфероном γ (IFN- γ) и/или G-CSF. Такая повышенная экспрессия увеличивает цитотоксическую активность клеток, несущих FcγRI, против мишеней. Эффекторная клетка может фагоцитировать или лизировать антитело-мишень или клетку-мишень.

Термин "антитело человека", как применяется в настоящей заявке, включает антитела, обладающие переменными и константными участками, произведенными из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или направленного мутагенеза *in vitro* или соматические мутации *in vivo*). Однако термин "антитело человека", как применяется в настоящей заявке, не включает антитела, у которых CDR последовательности, произведенные из зародышевых линий других видов млекопитающих, таких как мышь, были помещены среди каркасных последовательностей человека.

Как применяется в настоящей заявке, антитело человека "произведено из" последовательности определенной зародышевой линии человека, если антитело получено из системы с применением последовательностей иммуноглобулина человека, например, с помощью иммунизации трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, или посредством скрининга библиотеки генов иммуноглобулина человека и где выбранное антитело человека является по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 97%, например по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 99% идентичным по последовательности аминокислот аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевыми V_H или V_L сегментами гена переменного участка. Обычно антитело человека, произведенное из отдельного сегмента гена V_H или V_L переменного участка зародышевой линии человека, проявляет не более 10 аминокислот разницы, например не более 5, например не более 4, 3, 2 или 1 аминокислоты разницы по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Химерное антитело является антителом, которое содержит один или более участок одного антитела и один или более участок одного или более другого антитела, произведенного из других видов. Одновалентное химерное антитело является димером (HL), образованным химерной Н-цепью, связанной посредством дисульфидных связей с химерной L-цепью. Двухвалентное химерное антитело является тетрамером (H_2L_2), образованным двумя HL димерами, связанными посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи. Поливалентное химерное антитело можно также получить, например, с применением CH участка, который олигомеризуется (например, из Н цепи IgM или μ цепи). Обычно химерное ан-

титело относится к антителу, у которого часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности антител, произведенных из определенных видов или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, произведенных из других видов или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, а также фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую биологическую активность (см., например, US 4816567 и Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855 (1984)). Химерные антитела получают с помощью рекомбинантных подходов, хорошо известных в данной области техники (см., например, Cabilly et al., PNAS USA 81, 3273-3277 (1984), Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855 (1984), Boulianne et al., Nature 312, 643-646 (1984), EP 125023, Neuberger et al., Nature 314, 268-270 (1985), EP 171496, EP 173494, WO 86/01533, EP 184187, Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066-1074 (1986), WO 87/02671, Liu et al., PNAS USA 84, 3439-3443 (1987), Sun et al., PNAS USA 84, 214-218 (1987), Better et al., Science 240, 1041-1043 (1988) and Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)).

Гуманизированное антитело является антителом, которое произведено из отличных от человека видов, у которого определенные аминокислоты в кармашных и константных участках тяжелой и легкой цепей мутированы так, чтобы избежать или отменить иммунный ответ у человека. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, произведенную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (антитело реципиента), у которых остатки в гипервариабельном участке реципиента замещены остатками из гипервариабельного участка видов, отличных от человека (антитело донора), таких как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающими желаемыми антиген-связывающими характеристиками, такими как специфичность и сродство. В некоторых случаях остатки Fv каркасного участка (FR) иммуноглобулина человека замещают соответствующими нечеловеческими остатками. Далее гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются ни в антителах донора, ни в антителах реципиента. Такие модификации делают, чтобы далее оптимизировать свойства антител. По существу, гуманизированное антитело включает по большей части все из по крайней мере одного и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по большей части все гипервариабельные петли соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина и все или по большей части все FR участки являются таковыми последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело при необходимости также включает по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно из иммуноглобулина человека. Детали см. в Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988) and Presto, Cur. Op. Strict. Biol. 2, 593-596 (1992).

Термин "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела", как применяется в настоящей заявке, относится к получению молекул антитела единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единую специфичность связывания и сродство для определенного эпитопа. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, проявляющим единую специфичность связывания, у которых вариабельный и константный участки произведены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Моноклональные антитела человека могут производиться гибридомой, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного животного отличного от человека, такого как трансгенная мышь, обладающего геномом, включающим трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека, объединенные в бессмертной клетке. Моноклональное антитело может сокращенно обозначаться как mAb.

Термин "рекомбинантное антитело человека", как применяется в настоящей заявке, включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных подходов, такие как (а) антитела, выделенные из животного (такого как мышь), которое является трансгенным или трансхромосомным относительно генов иммуноглобулина человека, или гибридома, полученная из них (описанная в настоящей заявке далее), (б) антитела, выделенные из клетки хозяина, трансформированной для экспрессии антител, такой как трансфектома, (в) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и (г) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека включают вариабельные и константные участки, произведенные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных вариантах реализации, однако такие рекомбинантные антитела человека могут подвергаться *in vitro* мутагенезу (или когда применяют животное трансгенное относительно последовательностей иммуноглобулина человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и таким образом аминокислотные последовательности V_H и V_L участков рекомбинантных антител являются последовательностями, которые будучи произведенными из и родственными V_H и V_L последовательностям зародышевой линии человека, могут не существовать в природе среди набора антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Как применяется в настоящей заявке, "гетерологичное антитело" определено по отношению к трансгенному организму, отличному от человека, продуцирующему такое антитело. Этот термин отно-

сится к антителу, обладающему аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности, обнаруженной у организма, не представляющего собой животное, отличное от человека, и, по существу, из видов, отличных от этого трансгенного животного, отличного от человека.

"Выделенное антитело", как применяется в настоящей заявке, относится к антителу, которое, по существу, освобождено от других антител, обладающих другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD38, по существу, освобождено от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличающимися от CD38). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом CD38 человека, может, однако, обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например, из других видов (такими как видовые гомологи CD38). Далее выделенное антитело может, по существу, не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ. В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинации "выделенных" моноклональных антител, обладающих различными специфичностями, сочетаются в хорошо определенной композиции.

Как применяется в настоящей заявке, "специфическое связывание" относится к антиген-связывающему пептиду, такому как антитело, связывающемуся с предопределенным антигеном. Обычно, антиген-связывающий пептид, такой как антитело, связывается со сродством, соответствующим K_D около 10^{-7} М или менее, например около 10^{-8} М или менее, например около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} М или менее или около 10^{-11} М или еще меньше при определении с помощью техники поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с прибором BIAcore 3000 с применением рекомбинантного CD38 в качестве лиганда и анализируемого антитела. Антиген-связывающий пептид может связываться с предопределенным антигеном со сродством, соответствующим K_D , которая по меньшей мере в 10 раз ниже, например по меньшей мере в 100 раз ниже, например по меньшей мере в 1000 раз ниже, например по меньшей мере в 10000 раз ниже, например по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его сродство к неспецифическому антигену (например, БСА, казеину), другому, чем предопределенный антиген или близкородственный антиген. То, насколько сродство ниже, зависит от K_D антиген-связывающего пептида так, что когда K_D антиген-связывающего пептида очень низка (что означает очень высокую специфичность антиген-связывающего пептида), тогда разница, на которую сродство к антигену выше по сравнению со сродством к неспецифическому антигену, может составлять не менее 10000 раз. Фразы "антиген-связывающий пептид, узнающий антиген" и "антиген-связывающий пептид, специфичный для антигена" применяются взаимозаменяемо с термином "антиген-связывающий пептид, который специфически связывается с антигеном". Подобным образом, фразы "антитело, узнающее антиген" и "антитело, специфичное для антигена" применяются взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Термин " k_d " (s^{-1}), как применяется в настоящей заявке, относится к константе скорости реакции диссоциации данного комплекса антиген-антитело. Упомянутая величина называется также значением k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1} s^{-1}$), как применяется в настоящей заявке, относится к константе скорости реакции ассоциации для данного взаимодействия антиген-антитело.

Термин " K_D " (М), как применяется в настоящей заявке, относится к константе равновесия реакции диссоциации для данного взаимодействия антиген-антитело.

Термин " K_A " (M^{-1}), как применяется в настоящей заявке, относится к константе равновесия реакции ассоциации для данного взаимодействия антиген-антитело и получается посредством деления k_a на k_d .

Как применяется в настоящей заявке, "изотип" относится к классу антител (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

Как применяется в настоящей заявке, "переключение изотипа" относится к феномену, посредством которого класс или изотип антитела изменяется от одного класса иммуноглобулина на тот или другой класс иммуноглобулина.

Как применяется в настоящей заявке, "непереключенный изотип" относится к изотипическому классу тяжелой цепи, продуцируемому, когда переключение изотипа не имело места; СН ген, кодирующий непереключенный изотип, является, обычно, первым СН геном сразу после функционально реорганизованного VDJ гена. Переключение изотипов подразделяют на классическое или неклассическое переключение изотипа. Классическое переключение изотипа происходит с помощью рекомбинации, которая включает по меньшей мере один участок перестановки последовательности у трансгена. Неклассическое переключение изотипа может происходить, например, посредством гомологичной рекомбинации между $\sigma\mu$ человека и $\Sigma\mu$ (δ -связанная делеция) человека. Альтернативные механизмы неклассического переключения, такие как трансгенная и/или трансхромосомная рекомбинация среди других, могут происходить и осуществлять изотипическое переключение.

Как применяется в настоящей заявке, термин "последовательность переключения" относится к таким последовательностям ДНК, которые ответственны за рекомбинацию с переключением. Последовательность "донора переключения", обычно участок μ переключения, является 5' (т.е. выше по ходу) участком конструкции, который делегируется при рекомбинации с переключением. Участок "акцептора пе-

реключения" находится между участком конструкции, который делетируется, и заменяемым константным участком (например, γ , ϵ и т.д.). Поскольку нет специфического участка, где рекомбинация происходит всегда, окончательную последовательность гена обычно нельзя предсказать по конструкции.

Как применяется в настоящей заявке, "профиль гликозилирования" определяется как профиль расположения углеводородных единиц, которые ковалентно присоединены к белку, точнее к белку иммуноглобулина (антитела). Профиль гликозилирования гетерологичного антитела можно охарактеризовать как, по существу, близкую профилю гликозилирования, которая встречается в природе у антител, продуцируемых видами трансгенных животных, не являющихся человеком, причем рядовой специалист в данной области поймет, что профиль гликозилирования гетерологичного антитела ближе к упомянутому профилю гликозилирования у видов трансгенных животных, не являющихся человеком, чем у видов, из которых C_H гены трансгенных животных были произведены.

Термин "встречающийся в природе", как применяется в настоящей заявке по отношению к объектам, относится к факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, последовательность полипептида или полинуклеотида, присутствующая у организма (включая вирусы), которую можно выделить из природного источника и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

Термин "реорганизованный", как применяется в настоящей заявке, относится к конфигурации локуса тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, где V-сегмент расположен непосредственно рядом с D-J- или J-сегментом в конформации, кодирующей, по существу, полный V_H - или V_L -домен соответственно. Реорганизованный локус гена иммуноглобулина (антитела) можно идентифицировать посредством сравнения с ДНК зародышевой линии; в реорганизованном локусе будет по меньшей мере один рекомбинированный гептамерный/нонамерный элемент гомологии.

Термин "нереорганизованный" или "конфигурация зародышевой линии", как применяется в настоящей заявке по отношению к V-сегменту, относится к конфигурации, где V-сегмент не рекомбинирован так, чтобы быть непосредственно рядом с D- или J-сегментом.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты", как применяется в настоящей заявке, включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целой клетке, в клеточном лизате или в частично очищенной или, по существу, чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "по существу, очищенной", когда она отделена от других клеточных компонентов или других загрязнений, таких как другие клеточные нуклеиновые кислоты или белки, с помощью стандартных способов, включая обработку щелочью/ДСН, разделение в CsCl, колонную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы хорошо известные в данной области. (См. F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience New York (1987).)

Нуклеиновая кислота является "оперативно связанной", когда находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или усилитель оперативно связаны с кодирующей последовательностью, если они оказывают действие на транскрипцию последовательности. По отношению к транскрипции регуляторных последовательностей, оперативно связанная означает, что последовательности ДНК, будучи связаны являются смежными и, при необходимости, присоединены к двум участкам, кодирующим белок, непосредственно и в рамках считывания. Для последовательностей переключения, оперативно связанные указывает, что последовательности способны действовать на рекомбинацию с переключением.

Как применяется в настоящей заявке, термин "ингибирует рост" (например, по отношению к клеткам) включает любое измеримое уменьшение роста клеток при контакте с CD38BP, например анти-CD38 антителом, по сравнению с ростом тех же клеток в отсутствие контакта с CD38BP, таким как анти-CD38 антитело, например, ингибирование роста клеточной культуры по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

Как применяется в настоящей заявке, термины "ингибирует связывание" и "блокирует связывание" (например, по отношению к ингибированию/блокированию связывания CD38-связывающего партнера с CD38) применяются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование связывания CD38-связывающего партнера с CD38 может уменьшать или изменять нормальный уровень или тип клеточного сигнала, имеющего место, когда CD38-связывающий партнер связывается с CD38 в отсутствие ингибирования или блокирования. Ингибирование и блокирование также включают любое измеримое уменьшение сродства связывания CD38-связывающего партнера с CD38 при контакте с CD38BP, таким как анти-CD38 антитело, по сравнению с лигандом в отсутствие контакта с CD38BP, таким как анти-CD38 антитело, например блокирование связывания CD38-связывающего партнера с CD38 по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

"Клетка мишени" означает любую нежелательную клетку у субъекта (например, человека или животного), на которую может быть направлено действие композиции (включающей, например, CD38BP, например моноклональное анти-CD38 антитело человека и/или биспецифичную или мультиспецифич-

ную молекулу, направленную против CD38) настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации клетка мишени является клеткой, экспрессирующей или сверхэкспрессирующей CD38B. Клетки, экспрессирующие CD38, обычно включают гематопозитические клетки, такие как медуллярные тимоциты, активированные Т- и В-клетки, 80% покоящихся NK-клеток и моноцитов, лимфобласты центра размножения в лимфатическом узле, плазматические В-клетки и некоторые внутрифолликулярные клетки, древоидные клетки, нормальные клетки костного мозга, отдельные клетки предшественники, 50-80% кровяных клеток пуповины, эритроциты и кровяные пластинки. CD38 также может экспрессироваться негематопозитическими клетками, например, в кишечнике интраэпителиальными клетками и лимфоцитами lamina propria, клетками Пуркинье и нейрофибрилярными клубками в мозге, эпителиальными клетками простаты, β -клетками поджелудочной железы, остеокластами костей, ретинальными клетками глаза, сарколеммой гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры. Среди злокачественных клеток CD38 экспрессируется при различных злокачественных заболеваниях крови, включая, но не ограничиваясь этим, множественную миелому, первичный или вторичный лейкоз плазматических клеток, хронический лимфоцитарный лейкоз В-клеток, острый лимфоцитарный лейкоз В-клеток, макроглобулинемию Валденстрема, первичный системный амилоидоз, лимфому клеток мантии, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярную лимфому и лейкоз NK-клеток.

Термин "вектор", как применяется в настоящей заявке, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является плаزمид, что относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую можно лигировать дополнительный сегмент ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к независимой репликации в клетке хозяина, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное начало репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы, например неэписомальные векторы млекопитающих, интегрируются в геном клетки хозяина после введения в клетку хозяина и вследствие этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Далее определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они связаны на оперативном уровне. Такие векторы называются в настоящей заявке "рекомбинантными экспрессирующими векторами" или просто "экспрессирующими векторами". Обычно экспрессирующие векторы, применяемые в технике рекомбинантных ДНК, часто представлены в форме плазмид. Термины "плазмид" и "вектор" могут в настоящей заявке применяться взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее распространенной формой вектора. Однако изобретение охватывает и такие иные формы экспрессирующих векторов, как вирусные векторы (например, ретровирусы с нарушенной репликацией, аденовирусы и аденовирусные вирусы), которые выполняют такие же функции.

Термин "рекомбинантная клетка хозяина" (или просто "клетка хозяина"), как применяется в настоящей заявке, относится к клетке, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины относятся не только к клеткам данного субъекта, но и к потомству таких клеток. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или влияния окружающей среды, такое потомство может не быть, по существу, идентичным родительской клетке, но по-прежнему охватывается областью притязаний термина "клетка хозяина", как применяется в настоящей заявке. Рекомбинантные клетки хозяина включают, например, трансфектомы, такие как CHO клетки, NS/O клетки и лимфоцитарные клетки.

Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, усилители и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Специалисту в данной области будет ясно, что конструкция экспрессирующего вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки хозяина, которую будут трансформировать, желаемого уровня экспрессии белка и т.д. Примеры регуляторных последовательностей для экспрессии в клетках хозяина млекопитающего включают вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или усилители, произведенные из цитомегаловирусов (CMV), Simian virus 40 (SV40), аденовирусов (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Альтернативно, можно применять регуляторные последовательности невирусного происхождения, такие как убиквитиновый промотор или β -глобулиновый промотор.

Как применяется в настоящей заявке, термин "субъект" включает любого человека или любое животное, отличное от человека. Термин "животное, отличное от человека" включает всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, коровы, цыплята, земноводные, пресмыкающиеся и т.д.

Различные формы термина "трансфекция" охватывают широкое разнообразие техник, обычно применяемых для введения чужеродных ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку хозяина,

например электропорацию, соосаждение с фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную ДЭАЭ-декстраном, липофективную трансфекцию и т.п.

Термин "трансфектома", как применяется в настоящей заявке, включает рекомбинантные эукариотические клетки хозяина, экспрессирующие антитело, такие как CHO клетки, NS/O клетки, HEK293 клетки, клетки растений или грибов, включая дрожжевые клетки.

Термин "животное, отличное от человека" включает всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, коровы, цыплята, земноводные, пресмыкающиеся и т.д.

Термин "трансгенное животное, отличное от человека" относится к животному, отличному от человека, обладающему геномом, включающим один или более трансген тяжелой цепи человека и/или легкой цепи человека или трансхромосомы (интегрированные или неинтегрированные в природную геномную ДНК животного), которое способно экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген легкой цепи человека и трансген тяжелой цепи человека или трансхромосому тяжелой цепи человека, так что мышь продуцирует анти-CD38 антитела человека при иммунизации CD38 антигеном и/или клетки, экспрессирующие CD38. Трансген тяжелой цепи человека можно интегрировать в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных мышей, например NuMAb мышей, таких как HCo7 или HCo12 мышей, или трансген тяжелой цепи человека можно поддерживать вне хромосомы, как в случае трансхромосомных КМ мышей, как описано в WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (все вместе называемые "трансгенными мышами") способны продуцировать множественные изотипы моноклональных антител человека к данному антигену (таких как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), претерпевая V-D-J рекомбинацию и переключение изотипа. Трансгенное животное, отличное от человека, можно также применять для продукции антител против специфического антигена посредством введения генов, кодирующих такое специфическое антитело, например, с помощью оперативного связывания генов с геном, который экспрессируется в молоке животного.

Термин "специфичность" в настоящей заявке относится к способности CD38-связывающего пептида, такого как анти-CD38 антитело, узнавать эпитоп внутри CD38, при этом обладая только малой или никакой реактивностью по отношению к другим частям CD38 (включая другие эпитопы, которые связаны другими CD38BP, например анти-CD38 антителом). Специфичность можно определять относительно образом в анализах конкуренции, как описано в настоящей заявке. Специфичность можно более точно определять с помощью любых техник идентификации/характеризации эпитопа, описанной в настоящей заявке или их эквивалентов, известных в данной области.

Антитело, специфичное для данной антигенной детерминанты, может, однако, вступать в перекрестную реакцию с другими биологическими молекулами, которые могут присутствовать в ряде биологических окружений вместе с CD38. Более типично CD38BP, такое как анти-CD38 антитело, может вступать в перекрестную реакцию с гомологами CD38 из других видов. В любом или обоих случаях обычно такие перекрестно реагирующие антитела избирательны для CD38 человека по сравнению со сходными структурами и/или факторам среды.

Термин "избирательно" в настоящей заявке относится к предпочтительному связыванию CD38BP, например анти-CD38 антитела, с отдельным участком, мишенью или пептидом; обычно участком или эпитопом CD38 в противоположность одной или более другим биологическим молекулам, структурам, клеткам, тканям и т.д. В одном варианте реализации CD38BP, такое как анти-CD38 антитело настоящего изобретения, является избирательным к порции CD38 у клеток рака толстой кишки (например, анти-CD38 антитела избирательно связывается с порцией CD38 по сравнению с другими компонентами клетки рака толстой кишки).

CD38BP согласно настоящему изобретению обычно применяются и предоставляются, по существу, в выделенной форме. По существу, выделенной молекулой является молекула, которая является преобладающим видом в композиции, в которой она находится, среди класса молекул, к которому она относится (т.е. она составляет по меньшей мере около 50% типа молекул в композиции и обычно составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или более этого вида молекул, например пептидов, в композиции (например, композиция проявляет по меньшей мере около 98 или 99% гомогенности по CD38BP среди всех присутствующих видов пептидов)).

Выделенная молекула относится к молекуле, которая не связана со значительными уровнями (например, более чем приблизительно 1%, более чем приблизительно 2%, более чем приблизительно 3%, более чем приблизительно 5%) любых посторонних и нежелательных физиологических факторов, таких как не-CD38 связывающие биомолекулы (или CD38-связывающие молекулы), которые могут мешать связыванию и/или активности CD38BP по настоящему изобретению), содержащихся в клетке или у животного, где CD38BP продуцируется. Выделенная молекула также относится к любой молекуле, которая прошла этап очистки благодаря вмешательству человека (будь-то автоматическое, ручное или оба). Во многих различных композициях, предоставленных настоящим изобретением, например в композиции, включающей один или более фармацевтически приемлемый носитель, CD38BP может присутствовать в относительно небольшом количестве в терминах числа от общего количества молекулярных видов в

композиции (например, в случае композиции, включающей большое количество фармацевтически приемлемого носителя, стабилизатора и/или консерванта). В некоторых случаях дополнительные пептиды, такие как БСА, могут быть включены в такую композицию вместе с предварительно очищенным CD38BP. Однако при том, что такие дополнительные компоненты являются приемлемыми для предполагаемого применения CD38BP, такую композицию можно, тем не менее, считать содержащей выделенное CD38BP.

CD38BP по настоящему изобретению обычно, по существу не содержат других CD38BP, например CD38BP, обладающих другими антигенными специфичностями. Однако настоящее изобретение также предоставляет композицию, включающую несколько CD38BP с различными специфичностями и характеристиками (например, настоящее изобретение обеспечивает "коктейль" из CD38BP, обладающих различными характеристиками специфичности и/или избирательности).

"Обработка/лечение" означает введение эффективного количества терапевтически активного соединения настоящего изобретения с целью облегчения, улучшения или искоренения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 6.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 6.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 3.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 5.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 8.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 9.

В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR участки (V_L CDR1, CDR2 и CDR3) состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR участки (V_H CDR1, CDR2 и CDR3) состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP. В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В другом дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора вариабельных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях) так, что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант.

Ожидается, что любой из таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2, и V_H участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и, соответственно, может применяться для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 12.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 17.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 12, и V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 17.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 13.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 15.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 19.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 20.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR участки (V_L CDR1, CDR2 и CDR3), состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR участки (V_H CDR1, CDR2 и CDR3), состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP. В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В другом дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора вариативных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях) так, что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант.

Ожидается, что любой их таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 12, и V_H участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и, соответственно, может применяться для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 22.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 27.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 22, и V_H участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 27.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 23.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 24.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 25.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR1 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 28.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR2 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H

CDR3 участок, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 30.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_L CDR участки (V_L CDR1, CDR2 и CDR3) состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее V_H CDR участки (V_H CDR1, CDR2 и CDR3) состоящие, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 30 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP. В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В другом дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора вариабельных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях), так что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант.

Ожидается, что любой из таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и V_H участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 27, и, соответственно, может применяться для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_L CDR1, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 23, где один или более N-концевой остаток и/или один, два или три C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_L CDR2, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 24, где N-концевой остаток и/или один, два или три C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_L CDR3, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 25, где N-концевой остаток и/или один, два, три или четыре C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_H CDR1, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 28, где один, два, три или четыре N-концевых остатка и/или один, два, три или четыре C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_H CDR2, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 29, где один, два, три, четыре или пять N-концевых остатка и/или один, два, три, четыре, пять или шесть C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающий V_H CDR3, состоящий, по существу, из последовательности согласно SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 30, где один, два или три N-концевых остатка и/или один, два, три или четыре C-концевых аминокислотных остатка отсутствуют.

Настоящее изобретение также предоставляет CD38BP, где такие "усеченные" последовательности CDR комбинированы друг с другом и/или другими последовательностями CDR, описанными в настоящей заявке.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP.

В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора переменных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях), так что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант. Ожидается, что любой из таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2, и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP.

В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора переменных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях), так что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант. Ожидается, что любой из таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 12, и V_H участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 17.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее

(а) три V_L CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_L CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP, и

(б) три V_H CDR участка, которые независимо состоят, по существу, из последовательностей согласно SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 в тесной близости друг к другу (например, приблизительно с разрядкой V_H CDR участков у анти-CD38 антитела дикого типа) в CD38BP.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее гибкий линкер, расположенный между V_L участком и V_H участком CD38BP.

В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, где V_L и V_H участки присутствуют на отдельных цепях в скрученном белке иммуноглобулина и ориентированы таким образом, что V_L CDR1, CDR2 и CDR3 и V_H CDR1, CDR2 и CDR3 кооперативно связаны так, чтобы вносить вклад в избирательное и/или специфическое связывание антигенной детерминанты на CD38. В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который включает два набора переменных доменов (наборы связанных V_H и V_L доменов на связанных отдельных цепях), так что CD38BP включает два идентичных участка связывания антигенных детерминант. Ожидается, что любой из таких CD38BP, описанных в этом абзаце, по меньшей мере, отчасти обладает сходной специфичностью к эпитопу, избирательностью и другими характеристиками, как антитело, имеющее V_L участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и V_H участок, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение также предоставляет CD38BP, включающие функциональные варианты V_L участка, V_H участка или одного или более CDR антител примеров. Функциональный вариант V_L , V_H или CDR, примененные в составе CD38BP, все еще позволяет CD38BP сохранять, по меньшей мере, значительную часть (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) сродства/авидности и/или специфичности/избирательности родительского антитела и в некоторых случаях, например, такой CD38BP может обладать большим сродством, избирательностью и/или специфичностью, чем родительское антитело.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_L , состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_L CDR2, состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около 75%, например по меньшей мере около 80%, например по меньшей мере около 85%, например по меньшей мере около 90%, например по меньшей мере около 95% идентичности последовательности аминокислот любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14, где CD38BP обладает, по меньшей мере, значительной частью (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) эпитоп-связывающих характеристик антитела, обладающего вариантом V_L CDR2 последовательности согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 24, соответственно, например, антитела, включающего V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12, или SEQ NO: 22, соответственно, например, антитела, включающего V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7, или антитела, включающего V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17, или антитела, включающего V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_H, состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около 75%, например по меньшей мере около 80%, например по меньшей мере около 85%, например по меньшей мере около 90%, например по меньшей мере около 95% идентичности последовательности аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27, где CD38BP обладает, по меньшей мере, значительной частью (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90,

95% или более) эпитоп-связывающих характеристик антитела, обладающего вариантом V_H последовательности согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 27, соответственно, например, антитела, включающего и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_H CDR1, состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около 75%, например по меньшей мере около 80%, например по меньшей мере около 85%, например по меньшей мере около 90%, например по меньшей мере около 95% идентичности последовательности аминокислот любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 28, где CD38BP обладает, по меньшей мере, значительной частью (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) эпитоп-связывающих характеристик антитела, обладающего вариантом V_H CDR1 последовательности согласно SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 28, соответственно, например антитело, включающее V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27, соответственно, например, антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27, соответственно, например, антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_H CDR2, состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около 75%, например по меньшей мере около 80%, например по меньшей мере около 85%, например по меньшей мере около 90%, например по меньшей мере около 95% идентичности последовательности аминокислот любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 29, где CD38BP обладает, по меньшей мере, значительной частью (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) эпитоп-связывающих характеристик антитела, обладающего вариантом V_H CDR1 последовательности согласно SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 29, соответственно, например, антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27, соответственно, например, антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 соответственно.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, включающее вариант V_H CDR3, состоящий, по существу, из последовательности, обладающей по меньшей мере около 50%, например по меньшей мере около 60%, например по меньшей мере около 70%, например по меньшей мере около 75%, например по меньшей мере около 80%, например по меньшей мере около 85%, например по меньшей мере около 90%, например по меньшей мере около 95% идентичности последовательности аминокислот любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 30, где CD38BP обладает, по меньшей мере, значительной частью (по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) эпитоп-связывающих характеристик антитела, обладающего вариантом V_H CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 30, соответственно, например, антитело, включающее V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27, соответственно, например, антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12, или антитела, включающего V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 и V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 соответственно.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, поделенного на длину последовательности (т.е. % гомологии = $\frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$), принимая во внимание число разрывов и длину каждой бреши, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей достигается с применением математических алгоритмов, как описано в нижеследующих примерах, которые не являются ограничивающими.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с помощью программы GAP программного пакета GCG (доступного на <http://www.gcg.com>) с применением NWSgapdna, матрицы CMP, веса бреши 40, 50, 60, 70 или 80 и веса протяженности 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1989), включенного в программу ALIGN (версия 2.0), применяя таблицу веса остатков (weight residue table) PAM120, штраф за протяженность бреши (a gap length penalty) 12 и штраф за брешь (a gap penalty) 4. Дополнительно процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с применением алгоритма по Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970), включенного в программу GAP пакета GCG (доступного на <http://www.gcg.com>), с применением либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, веса бреши 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса протяженности 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белка согласно настоящему изобретению далее можно применять в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска по общедоступным базам данных для того, чтобы, например, идентифицировать родственные последовательности. Такие поиски можно проводить с применением программ BLASTN и XBLAST (версия 2.0) по Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов с применением BLAST можно проводить с помощью программы BLASTN с параметрами счет=100, длина слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Поиск белков с применением BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST с параметрами счет=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков согласно настоящему изобретению. Для получения выравниваний с брешиами с целями сравнения, можно применять Gapped BLAST, как описано у Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (т.е. XBLAST и BLASTN). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Последовательность CDR вариантов может отличаться от последовательностей CDR родительских антител наиболее консервативными замещениями, например по меньшей мере около 35%, около 50% или более, около 60% или более, около 70% или более, около 75% или более, около 80% или более, около 85% или более, около 90% или более, около 95% или более (например, приблизительно 65-99%) замещений у вариантов являются консервативными замещениями аминокислотных остатков. В контексте настоящего изобретения консервативные замещения можно определить как замещения внутри классов аминокислот, приведенных в одной или более из следующих таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замещений

Кислые остатки	Асп и Глу
Основные остатки	Лиз, Арг и Гис
Гидрофильные незаряженные остатки	Сер, Тре, Асн и Глн
Алифатические незаряженные остатки	Гли, Ала, Вал, Лей и Иле
Неполярные незаряженные остатки	Цис, Мет и Про
Ароматические остатки	Фен, Тир и Трп

Классы альтернативных консервативных замещений аминокислотных остатков

1	Ала (A)	Сер (S)	Тре (N)
2	Асп (D)	Глу (E)	
3	Асн (N)	Глн (Q)	
4	Арг (R)	Лиз (K)	
5	Иле (I)	Лей (L)	Мет (M)
6	Фен (F)	Тир (Y)	Трп (W)

Альтернативная физическая и функциональная классификация аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенил-связанные остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании поворотов	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Группировки более консервативного замещения включают валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин-лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Дополнительные группы аминокислот также можно образовать с применением принципов, описанных, например, в Creighton (1984) Proteins: Structure and Molecular Properties (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.

В одном варианте реализации настоящего изобретения консервативность в терминах свойств гидрофобности/гидрофильности и веса/размера остатков также, по существу, сохраняется у вариантов CDR

по сравнению с CDR антитела примеров (например, класс веса, оценка гидрофобности или оба у последовательностей сохраняются по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95% или более (например, приблизительно 65-99%). Например, консервативные замещения остатков могут также или альтернативно основываться на замещении по принципу сохранения сильной или слабой группы и по принципу веса групп, что известно в данной области.

Сохранение сходных остатков может также или альтернативно измеряться с помощью оценки сходства, как определяется в программе BLAST (например, BLAST 2.2.8 доступная через NCBI). Пригодные варианты, обычно, проявляют по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или более (например, приблизительно 70-99%) сходства с родительским пептидом.

Значительные изменения функции можно произвести, выбирая замещения, которые являются менее консервативными, чем показанные в определенных группах выше. Например, можно произвести неконсервативные замещения, которые более значительным образом повлияют на структуру пептида в области изменения, например структуру α -спирали или β -листов; заряд или гидрофобность молекулы на участке мишени; или объем боковых цепей. Замещениями, которые обычно считаются приводящими к наибольшим изменениям свойств пептида, являются такие, где 1) гидрофильный остаток, например серил или треонил, замещается (или замещает) гидрофобным остатком, например лейцилом, изолейцилом, фенилаланином, валином или аланином; 2) цистеин или пролин замещается (или замещает) любым другим остатком; 3) остаток, обладающий электроположительной боковой цепью, например лизил, аргинил или гистидил, замещается (или замещает) электроотрицательным остатком, например глутамином или аспартилом; или 4) остаток, обладающий объемистой боковой цепью, например фенилаланил, замещается (или замещает) остатком, у которого нет боковой цепи, например глицином. Соответственно, эти и другие неконсервативные замещения можно вводить в варианты пептида, когда требуются значительные изменения функции/структуры, и такие замещения избегают, когда требуется сохранять функцию/структуру.

Удобным способом образования вариантов замещений является созревание сродства с применением фага с помощью способов, известных в данной области. Для того чтобы идентифицировать возможные кандидаты для модификации среди участков гипервариабельных участков, можно проводить также мутагенез со сканированием аланина, чтобы идентифицировать остатки гипервариабельных участков, вносящие значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки, являются весьма подходящими кандидатами для замещения.

Когда для получения варианта антитела делают вставки в гипервариабельные участки, следует принимать во внимание типичный диапазон длины рассматриваемого вариабельного участка у известных антител. Например, для первого гипервариабельного участка вариабельного домена легкой цепи вставки можно вводить в V_L CDR1 последовательность родительского антитела, сохраняя при этом, по существу, близкий и поэтому ожидаемый нужный размер, который согласно Kabat et al., supra, например, обычно включает всего около 9-20 (например, около 10-17) остатков. Сходным образом, V_L CDR2 обычно имеет общую длину около 5-10 остатков, V_L CDR3 обычно имеет длину около 7-20 остатков; V_H CDR1 обычно имеет длину около 10-15 остатков, V_H CDR2 обычно имеет длину около 15-20 остатков, V_H CDR3 обычно имеет длину около 6-30 остатков (например, 3-25 остатков). Вставки в V_H участок обычно делают в V_H CDR3 и обычно поблизости от С-конца домена, например приблизительно около остатков 97-102 родительского V_H CDR3 (например, смежные с или С-концевые в последовательности с остатком номер 100 родительской V_H CDR3 последовательности), применяя сопоставление и нумерацию, как описано у Кабат. Варианты антитела со вставленными аминокислотными остатками в гипервариабельном участке могут быть сделаны случайным образом, особенно когда начальное сродство связывания родительского антитела с антигеном мишени является таковым, что полученные случайным образом варианты антитела легко подвергать скринингу. Например, фаговый дисплей предоставляет удобный способ скрининга таких случайных вариантов.

При разработке, конструкции и/или оценке вариантов CDR, можно уделить внимание тому факту, что CDR участки можно изменять, чтобы осуществить лучшее связывание с эпитопом. CDR антитела обычно действуют, предоставляя комплементарную поверхность, возможно, включающую пальцы, которые могут входить внутрь белковой поверхности антигена, или другую паратопическую структуру, к которой подходит эпитоп. Если эпитоп подходит не плотно, то антитело не может проявлять высокого сродства. Однако, как и в случае эпитопа, часто имеются несколько ключевых остатков в структуре паратопа, которые вносят основной вклад в это связывание. Таким образом, последовательности CDR могут значительно варьировать по длине и составу от антитела к антителу для того же пептида. Опытный

специалист в данной области поймет, что определенные остатки, такие как остатки тирозина (например, в составе V_H CDR3 последовательностей), которые часто являются важными участниками в связывании эпитопа, обычно сохраняются в вариантах CDR.

Варианты CDR участка могут также увеличить контакты аминокислот между антигеном и вариантом антитела по сравнению с контактами аминокислот между антигеном и родительским антителом, посредством введения одного или более аминокислотного остатка (посредством замещения или вставки), которые увеличивают контакты или энергетически предпочтительные взаимодействия между одной или более аминокислотными остатками, присутствующими у антигена, и одним или более аминокислотными остатками, присутствующими у антитела. Рассматриваемые взаимодействия аминокислот можно выбирать из водородных связей, Ван-дер-Вальсовых взаимодействий и ионных связей.

Специалисты в данной области осведомлены о дополнительных принципах, применяемых при конструкции и выборе CD38BP, включающих CDR варианты антител согласно настоящему изобретению.

Среди CDR вариантов, которые являются вариантами CDR антител из примеров, особенно среди варианта CDR у анти-CD38 антител или их фрагментов, остатки, необходимые для поддержания и/или ориентации структурной петли в структуре CDR обычно могут сохраняться; остатки, попадающие в радиус 10 Å от CDR структурной петли (но при необходимости только те остатки в этой области, у которых доступная водным растворителям поверхность составляет 5 Å² или более) обычно могут быть неизменными или измененными только посредством консервативных замещений аминокислотных остатков; и/или аминокислотная последовательность может обычно подвергаться только ограниченному числу вставок и/или делеций (если такие есть), так что петлеобразные структуры CDR сохраняются у варианта (описание нужных подходов и относящихся к этому принципов предоставлено, например, в Schiweck et al., J. Mol. Biol. 268(5), 934-51 (1997), Morea, Biophys Chem. 68(1-3), 9-16 (1997), Shirai et al., FEBS Lett. 399(1-2), 1-8 (1996), Shirai et al., FEBS Lett. 455(1-2), 188-97 (1999), Reckzo et al., Protein Eng. 8(4), 389-95 (1995) и Eigenbrot et al., J. Mol. Biol. 229(4), 969-95 (1993). См. также WO 03/048185, WO 03/070747 и WO 03/027246.

Дополнительные способы, которые можно применять для получения вариантов антител, включают направленную эволюцию и другие варианты подходов, описанные, например, в US 20040009498, Marks et al., Methods Mol. Biol. 248, 327-43 (2004), Azriei-Rosenfeld et al., J. Mol. Biol. 335(1), 177-92 (2004), Park et al., Biochem Biophys Res Commun. 275(2), 553-7 (2000), Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA. 88(24), 11120-3 (1991), Zahnd et al., J. Biol. Chem. 279(18), 18870-7 (2004), Xu et al., Chem Biol. 9(8), 933-42 (2002), Border et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA. 97(20), 10701-5 (2000), Crameri et al., Nat. Med. 2(1), 100-2 (1996) и как описано по существу, например, в WO 03/048185.

Полученные варианты антител можно подвергать любой подходящей технике скрининга и антитела с необходимыми и желательными улучшенными свойствами согласно одному или более соответствующему анализу можно отбирать для дальнейшего развития.

CDR38, включающие CDR последовательности, как описано выше, могут включать любое подходящее число и сочетание таких V_L и V_H CDR, при этом сохраняя, по меньшей мере, основную часть (по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) сродства/авидности и/или специфичности/избирательности антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, и/или антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, и/или антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27, но при необходимости отличаясь по другим характеристикам, таким как иммуногенность у больного человека, сродство к эпитопу, увеличенное время полужизни и т.д. В некоторых случаях, например, CD38BP может обладать большим сродством, избирательностью и/или специфичностью, чем родительское антитело. В одном варианте реализации в CD38 настоящего изобретения присутствует меньше полного набора участков V_L CDR и/или V_H CDR. В одном варианте реализации присутствуют все участки V_L CDR и V_H CDR.

Примерами других функциональных свойств антител, которые можно изменить или сохранить у вариантов CD38BP настоящего изобретения по сравнению с -003 и -005 и -024, являются

- (1) высокое сродство связывания с CD38;
- (2) низкая скорость диссоциации комплекса с CD38;
- (3) ингибирование или блокирование связывания с CD38-мишенью;
- (4) уничтожение Т-клеток или В-клеток, экспрессирующих CD38;
- (5) индукция высокого уровня CDC либо CD55/59 отрицательных, либо CD55/59 положительных клеток;
- (6) перенос в липидные бляшки при связывании CD38;
- (7) наведение толерантности Т-клеток;
- (8) ингибирование пролиферации Т- или В-клеток, экспрессирующих CD38;
- (9) интернализация CD38;
- (10) ингибирование индукции ферментативной активности CD38;
- (11) ингибирование индукции CD38-индуцированного переноса сигнала;

- (12) индукция или ингибирование продукции цитокинов;
- (13) индукция или блокирование дифференциации Т- или В-клеток;
- (14) индукция или спасение от апоптоза;
- (15) аттенуация или наращивание индукции лизиса с помощью NK-клеток;
- (16) индукция или ингибирование продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы;
- (17) продолженное выживание субъекта, несущего опухолевые клетки, экспрессирующие CD38

и/или

(18) индукция ADCC мишеней CD38 при смешивании с подходящими эффекторными клетками. Настоящее изобретение также предоставляет CD38BP, которые охарактеризованы с точки зрения их способности конкурировать (конкурентно ингибировать) или перекрестно конкурировать (т.е. частично ингибировать связывание эпитопа) с антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7 (как антитело -003), или с антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 (как антитело -005), или с антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 (как антитело -024), за связывание CD38.

Такое CD38BP может быть, например, Fab фрагментом, произведенным из антитела, которое связывается с эпитопом, идентичным или перекрывающимся с эпитопом, связываемым антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 7, или с антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17, или с антителом, имеющим V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27. Такой Fab фрагмент благодаря своему относительно малому размеру по сравнению с молекулами mAb не может значительно конкурировать с упомянутыми антителами за связывание CD38, хотя антитело, от которого он произведен, конкурирует. Однако такое CD38BP может быть полезным при нацеливании сходным образом на близкорасположенные участки CD38 (например, при нацеливании цитотоксина, радиоактивного ядра или в составе иммуноконъюгата CD38BP). Поэтому такие CD38BP могут быть полезными среди способов настоящего изобретения и, соответственно, они также предоставлены настоящим изобретением.

Конкуренцию за связывание с CD38 или частью CD38 для двух или более CD38BP можно определять с помощью подходящей техники. В одном варианте реализации конкуренцию определяют, как описано в примерах 7, 8 и 9.

Конкуренция в контексте настоящего изобретения относится к любому заметному уменьшению склонности отдельной молекулы связывать данный партнер связывания в присутствии другой молекулы, которая связывается с этим партнером связывания. Обычно конкуренция означает не менее чем приблизительно 10% уменьшение, например не менее чем приблизительно 15% уменьшение или не менее чем приблизительно 20% уменьшение связывания между CD38BP и

(а) формой CD38 (например, "обработанным", "зрелым", "необработанным", "необработанным" или "незрелым" CD38);

(б) формой свободного CD38 (например, CD38 фрагмента, продуцируемого с помощью *in vivo* процесса (обработки));

(в) гетеродимерным пептидом, состоящим из другого пептида, связанного с CD38, например CD31, и CD38;

(г) комплексом CD38 с одним или более субстратом, например цАМФ, НАД⁺ и/или цАДФ;

(д) димеризованным, связанным и/или обработанным димером CD38 с растворимым лигандом, например CD31; или

(е) частью CD38,

обусловленное присутствием другого CD38BP, как определяют, например, с помощью анализа с ELISA или FACS анализа (как описано в разделе примеров) применяя достаточные количества двух или более конкурирующих CD38BP и молекул CD38. Может также случиться, что конкуренция может существовать между CD38BP по отношению к более чем одному CD38 и/или части CD38, например, когда свойства связывания антитела данного участка CD38 сохраняются у его фрагментов, например, в случае хорошо представленного линейного эпитопа, расположенного на различных исследуемых фрагментах, или конформационного эпитопа, который присутствует у достаточно больших CD38 фрагментов, а также у CD38.

Оценка конкуренции обычно включает оценку относительного ингибирования связывания с применением первого количества первой молекулы, второго количества второй молекулы и третьего количества третьей молекулы (или стандарта, определенного посредством изучения связывания, которое можно приемлемым образом сравнить с новыми данными по связыванию по отношению к первой и второй молекулам в качестве заменителя действительных полученных одновременно данных), где первое, второе и третье количества являются достаточными для проведения сравнения, которое дает информацию об избирательности и/или специфичности рассматриваемых молекул по отношению к другим присутствующим молекулам. Первое, второе и третье количества могут варьировать в зависимости от природы рассматриваемых CD38BP и потенциальных мишеней. Например, для оценки с помощью ELISA, сходных с

описанными в разделе примеров, около 5-50 мкг (например, приблизительно 10-50 мкг, приблизительно 20-50 мкг, приблизительно 5-20 мкг, приблизительно 10-50 мкг и т.д.) CD38BP и/или CD38 мишеней необходимо, чтобы определить наличие конкуренции. Условия также должны быть подходящими для связывания. Обычно физиологические или близкие к физиологическим условия (например, температуры около 20-40°C, pH около 7-8 и т.д.) годятся для CD38BP:CD38 связывания.

Часто конкуренцию устанавливают как значительно большее относительное ингибирование, чем приблизительно 5%, как определяют с применением ELISA и/или FACS анализа. Может быть необходимым установить более высокий порог относительного ингибирования в качестве критерия/детерминанты необходимого уровня конкуренции в данном контексте (например, когда конкурентный анализ применяют для отбора или скрининга новых антител, созданных с целенаправленной функцией блокировки связывания другого пептида или молекулы с CD38 (например, природных партнеров связывания CD38, таких как CD31, также называемого CD31 антигеном, EndoCAM, GPIIA', PECAM-1, молекулы адгезии кровяных пластинок/эндотелиальных клеток или встречающегося в природе анти-CD38 антитела). Так, например, возможно установить критерий конкурентоспособности, где детектируется не менее приблизительно 10% относительного ингибирования, не менее приблизительно 15% относительного ингибирования или не менее приблизительно 20% относительного ингибирования, до того, как антитело считается достаточно конкурентоспособным. В тех случаях, когда эпитопы, принадлежащие конкурирующим антителам, близко расположены на антигене, конкуренция может быть установлена на величине больше приблизительно 40% относительного ингибирования связывания CD38 (например, не менее приблизительно 45% ингибирования, например не менее приблизительно 50% ингибирования, например не менее приблизительно 55% ингибирования, например не менее приблизительно 60% ингибирования, например не менее приблизительно 65% ингибирования, например не менее приблизительно 70% ингибирования, например не менее приблизительно 75% ингибирования, например не менее приблизительно 80% ингибирования, например не менее приблизительно 85% ингибирования, например не менее приблизительно 90% ингибирования, например не менее приблизительно 95% ингибирования или более высоким уровнем относительного ингибирования).

Конкуренцию можно считать обращением перекрестной реактивности между молекулой и двумя потенциальными партнерами связывания. В определенных вариантах реализации CD38BP настоящего изобретения специфически связывается с одним или более остатками или участками CD38, а также не вступает в перекрестную реакцию с другими пептидами, пептидными участками или молекулами, например, настоящее изобретение обеспечивает анти-CD38 антитело, которое не вступает в перекрестную реакцию с белками, гомологичными CD38, например BST-1 (антиген 1 клетки стромы костного мозга) и Мо5, также называемым CD157; или анти-CD38 антитела, которые не вступают в перекрестную реакцию с CD38 в нормальной ткани, например ткани, не вовлеченной во множественную миелому. Обычно недостаток перекрестной реактивности означает менее чем приблизительно 5% относительного конкурентного ингибирования между молекулами при определении с помощью ELISA и/или FACS анализа с применением достаточных количеств молекул в подходящих условиях анализа.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которое конкурирует с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, например антителом -003, за связывание CD38 или его части.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которое конкурирует с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, например антителом -005, за связывание CD38 или его части.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которое конкурирует с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27, например антителом -024, за связывание CD38 или его части.

Как обсуждается в настоящей заявке в другом месте, если не указано обратное или не противоречит контексту, ссылки на связывание CD38BP с CD38 относятся к связыванию в любом подходящем контексте, например в контексте конформации, когда присутствует структура CD38, или в контексте линейного эпитопа. Конечно, связывание в ограниченном наборе таких контекстов может быть важной характеристикой по отношению к CD38BP предоставляемого настоящим изобретением.

Дополнительные способы определения специфичности CD38BP с помощью конкурентного ингибирования можно найти, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)).

CD38 человека включает большое число различных эпитопов, которые могут включать (1) пептидные антигенные детерминанты, заключенные внутри одной пептидной цепи в CD38 человека; (2) конформационные антигенные детерминанты, которые состоят из одной или более несоседних аминокислот на данной цепи и/или аминокислот, присутствующих на соседствующих в пространстве, но разных пептидных цепях (обычно, когда соответствующие аминокислотные последовательности цепей расположены разрозненно в полипептидной последовательности CD38 человека); (3) пост-трансляционные антигенные детерминанты, которые состоят целиком или частично из молекулярных структур, ковалентно

присоединенных к CD38 человека, например углеводородных групп, или (4) сочетаний по пп.(1)-(3).

Эпитоп в контексте настоящего изобретения включает любой пептид или произведенную из пептида детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином. Эпитоп может включать любое необходимое число аминокислот в любом необходимом положении (относительно линейной последовательности CD38), ориентации (относительно организованного в пространстве CD38 или его фрагмента), любого аминокислотного состава (и следовательно, по меньшей мере частично, заряда). Так, например, эпитоп может состоять из приблизительно 3-10 аминокислот, обычно из 3-8 аминокислот в одном или более смежном или несмежном положении относительно первичной последовательности CD38 (например, эпитоп может состоять, по существу, из 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков, распределенных по 1, 2, 3, 4 или 5 несмежным положениям в CD38). Альтернативно, например, эпитоп может считаться определенным участком из приблизительно 5-40 смежных аминокислотных остатков (например, приблизительно 7-30 аминокислотных остатков, приблизительно 5-20 аминокислотных остатков или приблизительно 3-15 аминокислотных остатков) в CD38 (отдельно или в сочетании с частью смежного домена CD38). В некоторых эпитопах может случиться, что только один аминокислотный остаток или всего несколько аминокислотных остатков являются критическими для узнавания одного CDR или ряда CDR (и поэтому наиболее важными для CD38BP:CD38 антигенного сродства и авидности). Если так, эпитоп можно охарактеризовать на основе одного или более таких критических остатков с пониманием того, что другие остатки могут также вносить некий меньший вклад в эпитоп. В случае эпитопа, определенного участком аминокислот, может быть, что одна или более аминокислота участка вносит очень малый или даже пренебрежимый вклад в связывание антитела, так что этот остаток может быть замещен другим подходящим остатком без потери эпитопа, по меньшей мере, для некоторых CD38BP, для него специфичных.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, например анти-CD38 антитело, которое специфически связывается с CD38 эпитопом, который также специфически связан с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7 (например, антителом -003), или с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17 (например, антителом -005), или с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 (например, антителом -024). Возможно, что CD38BP, обладающие одним или более CDR, которые отличаются от CDR антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, или CDR антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, или CDR антитела, обладающего V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27, могут тем не менее быть специфичными для того же эпитопа, как антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, и антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, и антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 соответственно. В некоторых из таких случаев рассматриваемые CD38BP могут узнавать или быть более специфичными/избирательными для отдельных структур или участков эпитопа, чем антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, и антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, и антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 соответственно.

CD38 эпитоп, связываемый антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7 (например, антителом -003), или с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17 (например, антителом -005), или с антителом, обладающим V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 (например, антителом -024), можно идентифицировать с помощью стандартных техник картирования и описания, дальнейшее усовершенствование которых можно идентифицировать с помощью любого подходящего подхода, многочисленные примеры которых доступны специалисту в данной области. Эти подходы можно также применять для идентификации и/или характеристики эпитопов для CD38BP, по существу. В качестве примера таких способов картирования/характеристики, эпитоп для анти-CD38 антитела можно определить с помощью техники "отпечатка" эпитопа ("foot-printing") с применением химической модификации доступных аминов/карбоксилов белка CD38. Одним из примеров такой техники "отпечатка" является применение HXMS (обмен водород-дейтерий, детектируемый с помощью масс-спектрометрии), где водород/дейтерий обмен амидных протонов белка рецептора и лиганда, связывание и обратный обмен происходят, когда амидные группы боковых цепей, участвующие в связывании белка, защищены от обратного обмена и поэтому остаются дейтерированными. Задействованные участки можно идентифицировать на этом этапе с помощью протеолиза пептидов, быстрой микроколоночной жидкостной хроматографии высокого разрешения и/или масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее. См., например, Ehring H.,

Analytical Biochemistry, 267(2) 252-259 (1999) and/or Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Другим примером подходящей техники идентификации эпитопа является картирование эпитопа с применением ядерного магнитного резонанса (ЯМР), где обычно сравнивают положение сигналов в двумерных спектрах ЯМР свободного антигена и антигена в комплексе с антиген-связывающим пептидом, например антителом. Антиген обычно избирательно помечен с помощью изотопа ^{15}N , так что в ЯМР-спектре видны только сигналы, соответствующие антигену, и никаких сигналов антиген-связывающего пептида. У сигналов антигена, принадлежащих аминокислотным остаткам, участвующим во взаимодействии с антиген-связывающим пептидом, обычно сдвинуто положение в спектрах комплексов по сравнению со спектрами свободного антигена, и аминокислоты, участвующие в связывании, можно идентифицировать таким способом. См., например, Ernst Schering Res Found Workshop. (44), 149-67 (2004), Huang et al., Journal of Molecular Biology 281(1), 61-67 (1998) and Saito and Patterson, Methods. 9(3), 516-24 (1996). Картирование/характеристику эпитопа можно проводить с применением способов масс-спектрометрии. См., например, Downward, J. Mass Spectrom. 35(4), 493-503 (2000) and Kiselar and Downard, Anal. Chem. 71(9), 1792-801 (1999).

Техники обработки протеазы также являются полезными для картирования и идентификации эпитопа. Относящиеся к антигенным детерминантам участки/последовательности можно определять с помощью переваривания протеазами, например, применяя обработку трипсином в соотношении около 1:50 к CD38 в течение ночи (т/н) при 37°C и pH 7-8 с последующей масс-спектрометрическим (МС) анализом для идентификации пептидов. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином в присутствии CD38BP, можно далее идентифицировать посредством сравнения образцов, подвергнутых трипсиновой обработке, и образцов, инкубированных с CD38BP, и затем подвергнутых перевариванию, например, трипсином (таким образом, выявляя "отпечатки" мест связывания). Другие ферменты, например химотрипсин, пепсин и т.д., можно также или альтернативно применять для сходного способа характеристики эпитопа. CD38BP, который дает, по существу, такой же результат, как антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024), при таких измерениях считаются антителом, которое связывает тот же эпитоп, как антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антитело, обладающее V_L последовательностью согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательностью согласно SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024) соответственно. См., например, Manca, Ann Ist Super Sanita. 27(1), 15-9 (1991) для обсуждения сходных техник.

Картирование эпитопа посредством конкурентного связывания CD38 с двумя антителами, где одно биотинилировано, является другим способом идентификации соответствующих участков антигенных детерминант.

Связывание антител с линейными или петлевыми пептидами CD38 с применением основанного на PEPSCAN связанного с ферментом иммуно-анализа является другим способом идентификации соответствующих участков антигенных детерминант, см., например, Sloodstra-J.W. et al. Mol-Divers. 1, 87-96 (1996).

Сайт-направленный мутагенез является другим способом идентификации соответствующих участков антигенных детерминант, см., например, Polyak and Deans, Blood 99, 3956-3962 (2002).

Различные техники фагового дисплея также можно применять для идентификации эпитопов. См., например, Wang and Yu, Curr Drug Targets. 5(1), 1-15 (2004), Burton, Immunotechnology. 1(2), 87-94 (1995 Aug), Cortese et al., Immunotechnology. 1(2), 87-94 (1995) and Irving et al., Curr Opin Chem Biol. 5(3), 314-24 (2001). Обобщающие типичные эпитопы можно также идентифицировать с помощью модифицированных техник фагового дисплея (см. <http://www.cs.montana.edu/~mumey/papers/jcb03.pdf>) для обсуждения.

Другие способы, потенциально полезные для картирования эпитопов, включают кристаллографические техники, техники дифракции рентгеновских лучей (такие как техника исследования последовательности с помощью дифракции рентгеновских лучей, разработанная Поляк и др. в 1970-1980 гг.) и приложение многоштырьковой технологии пептидного синтеза (Multipin Peptide Synthesis Technology). Компьютерные способы, например анализ последовательности и трехмерный структурный анализ и анализ стыковки, можно также применять для идентификации антигенных детерминант. Например, эпитоп можно также определить с помощью молекулярного моделирования с применением структуры CD38 и стыковки со структурой Fab фрагмента индивидуального моноклонального антитела. Эти и другие способы картирования обсуждаются в Epitope Mapping A Practical Approach (Westwood and Hay Eds.) 2001 Oxford University Press.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, обладающее, по существу, такими же характеристиками специфического связывания одного или более mAbs, выбранными из антител, имеющих V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 2 и V_H последовательность согласно

SEQ ID NO: 7 (например, антитело -003), или антител, имеющих V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 12 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 17 (например, антитело -005), или антител, имеющих V_L последовательность согласно SEQ ID NO: 22 и V_H последовательность согласно SEQ ID NO: 27 (например, антитело -024).

Проведение картирования показывает, что несколько моноклональных антител, выработанных против CD38 человека, связываются с эпитопом на С-концевом участке CD38 (220-296) (Hoshino et al. and Ferrero et al.). Внутри этого участка обнаружены различия в три аминокислоты между последовательностями CD38 человека и ливанской макаки циномогуса (*cynomolgus*): T237, Q272 и S274 у человека соответствуют A238, R273 и F275 у обезьяны. -005 не связывается с тканью циномогуса (см. примеры 10 и 11). Существует ограниченное число различающихся аминокислот между последовательностями CD38 у человека и обезьяны, например, в С-концевой части белка, например три следующие аминокислоты различаются в последовательностях CD38 человека и обезьяны: T237, Q272 и S274 в CD38 человека соответствуют A238, R273 и F275 в CD38 циномогуса (сравнить SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22). -005 не связывается с мутантным белком huCD38, где глутаминовый остаток в положении 272 SEQ ID NO: 31 замещен остатком аргинина (Q272R), или с мутантным белком huCD38, где остаток серина в положении 274 SEQ ID NO: 31 замещен остатком фенилаланина (S274F) (показано в примере 17) в той же степени, как оно связывается с CD38 человека дикого типа. Связывание -005 в особенности изменяется при замещении аминокислоты в положении S274F.

Далее настоящее изобретение обеспечивает пептиды, которые связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 31), и которые не связываются с мутантным CD38 человека, где остаток глутамина в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33) в той же степени, как они связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Настоящее изобретение обеспечивает пептиды, которые связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 31), и не связываются с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34) в той же степени, как они связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Термин "в той же степени" следует интерпретировать так, что связывание пептида с мутантным CD38 человека значительно ниже, чем связывание пептида с диким типом CD38 человека. Связывание пептида с молекулами CD38 (дикого типа и мутанта) можно определить многими способами и определение того, считается ли связывание с мутантным белком "значительно ниже", чем связывание с диким типом, находится в пределах обычных знаний специалиста в данной области. Большое число различных техник для определения связывания пептида с другим пептидом доступны специалисту в данной области, например, ELISA, радиоиммуноанализ, BIAcore или проточная цитометрия.

Одним способом определения связывания является определение EC_{50} для связывания пептида с мутантным белком и с белком дикого типа и сравнение полученных величин. Другим способом определения связывания является рассмотрение амплитуды связывания при насыщающей концентрации (например, на плато сигнала связывания) или посредством определения кинетических констант скорости k_{on} и k_{off} , например, с помощью BIAcore.

В одном варианте реализации связывание рассматриваемого пептида с CD38 белками (мутантом или диким типом) проводят с помощью ELISA, как описано в примере 17.

В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации, EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 10% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 5% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 1% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток глутамина в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), составляет менее 50% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток глутамина в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), составляет менее 10% EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте реализации пептиды согласно изобретению связываются с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32) в той же степени, как они связываются с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 75% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 че-

ловека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 85% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 90% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31). В одном варианте реализации EC_{50} для связывания пептида с мутантным CD38 человека, где остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), составляет более 95% величины EC_{50} для связывания пептида с CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

Чтобы идентифицировать более специфически возможные участки антигенных детерминант в CD38, можно применять различные предсказательные аналитические подходы. В первом аналитическом подходе CD38 можно анализировать на (1) участки с высокой гидропатичностью (применяя способ Кайт-Дулитл (Kyte-Doolittle)); (2) антигенность при определении по способу индекса выпячивания; (3) антигенность при определении по способу Паркера; (4) антигенность при определении по способу Хопп/Вуда и (5) гидрофильность при определении по способам Голдмана, Энглемана и Стайца. Последовательность в интервале длины 10-40 аминокислот можно выбирать на основе проявления одного или более из этих свойств. Обоснованием такого подхода является общепринятая идея, что многие идеальные эпитопы В-клеток являются гидрофильными, ориентированными на поверхность и гибкими последовательностями из приблизительно 8-10 аминокислот длиной.

Настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, специфичные к CD38-участкам CD38, идентифицированные таким образом. Далее концы таких последовательностей можно сравнивать с предсказанными участками антигенных детерминант, локализованными с помощью других аналитических подходов, описанных в настоящей заявке для предоставления дополнительных специфических участков, содержащих вероятные антигенные детерминанты. Другие похожие сравнения можно легко проделать, чтобы предоставить дополнительные участки возможных антигенных детерминант, где связывание CD38BP с этими участками антигенных детерминант может считаться еще одним свойством настоящего изобретения.

В одном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является антителом. Не накладывающими ограничений примерами CD38-связывающих молекул иммуноглобулина, предоставленных настоящим изобретением, включают (а) полную функциональную молекулу иммуноглобулина, включающую: (1) две идентичные химерные тяжелые цепи, включающие переменный участок с антигенной специфичностью поверхности В-клетки человека и константный участок человека, и (2) две целиком идентичные (т.е. нехимерные) легкие цепи человека; (б) полную функциональную молекулу иммуноглобулина, включающую: (1) две идентичные химерные тяжелые цепи, включающие переменный участок, как указано, и константный участок человека, и (2) две целиком идентичные (т.е. нехимерные) легкие цепи нечеловека; (в) моновалентное антитело, т.е. полная функциональная молекула иммуноглобулина, включающее: (1) две идентичные химерные тяжелые цепи, включающие переменный участок, как указано, и константный участок человека, и (2) две разные легкие цепи, только одна из которых обладает такой же специфичностью, как и переменный участок тяжелых цепей. Получающаяся молекула антитела связывается только одним своим концом и поэтому неспособна к двухвалентному связыванию. В качестве другой иллюстрации относящиеся к иммуноглобулинам пептиды, предоставленные настоящим изобретением, можно сказать, включают следующие: (а) целую молекулу иммуноглобулина; (б) scFv; (в) моноклональное антитело; (г) химерное антитело; (д) гуманизированное антитело; (е) Fab фрагмент; (ж) Fab' фрагмент; (з) F(ab') фрагмент; (и) Fv молекулу; (к) Fv молекулу, связанную дисульфидной связью.

В одном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является поликлональным антителом. В одном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является моноклональным антителом. В дополнительном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является моноклональным антителом человека. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является гуманизированным антителом. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является химерным антителом. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является моноклональным антителом, целиком происходящим из видов млекопитающих, отличных от человека. В другом дополнительном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является целиком мышинным моноклональным антителом.

Моноклональное антитело относится к композиции, включающей гомогенную популяцию антител, обладающих единообразной структурой и специфичностью. Обычно моноклональное антитело является антителом, полученным из популяции, по существу, гомогенных антител, например индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и каждое моноклональное антитело обычно направлено против единственного эпитопа, в противоположность препаратам поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных эпитопов. Свойство моноклональности не следует толковать как требование производства антител неким особым способом. Например, моноклональные антитела настоящего изобретения можно продуцировать с помощью гибридомного способа, впервые описанного Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), или можно получать с помощью ДНК-

рекомбинантных способов. Моноклональные антитела можно также выделять из фаговых библиотек антител, применяя техники, описанные, например, в Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991).

Моноклональные антитела можно получать из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела можно получать из гибридом, полученных из В-клеток селезенки мыши, полученных из мыши, иммунизированной нужным антигеном, например, в форме клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей нужный антиген. Моноклональные антитела можно также получать из гибридом, произведенных из экспрессирующих антитела клеток иммунизированных людей или млекопитающих, отличных от человека, таких как крысы, собаки, приматы и т.д.

Альтернативно, гены клонированных антител можно экспрессировать в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, например микроорганизмы, например, *E. Coli* для получения одноцепочечных Fv антител, водоросли, а также клетки насекомых. Далее антитела можно получать с помощью трансгенных животных, отличных от человека, например, в молоке овец или кроликов или в куриных яйцах, или в трансгенных растениях. См., например, Verma, R., et al., *J. Immunol. Meth.* 216, 165-181 (1998); Pollock, et al., *J. Immunol. Meth.* 231, 147-157 (1999); и Fischer, R., et al., *Biol.Chem.* 380, 825-839 (1999).

В одном варианте реализации моноклональные антитела человека, направленные на CD38, можно получать с помощью трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Такие трансгенные или трансхромосомные мыши называются в настоящей заявке HuMAb мыши и KM мыши, соответственно, и все вместе называются "трансгенные мыши". Моноклональные антитела человека, вырабатываемые у таких мышей, можно сокращенно называть HuMAb.

HuMAb мышь несет минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неорганизованные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой (κ) цепи иммуноглобулина человека вместе с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ цепи (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Соответственно, мышь проявляет пониженную экспрессию мышинового IgM или κ и в ответ на иммунизацию, внесенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию, чтобы вырабатывать моноклональные антитела IgG, κ с высоким сродством (Lonberg, N. et al. (1994), supra; reviewed in Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) and Harding, F. and Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). Получение HuMAb детально описано в Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). См. также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7 несут нарушение JKD в своих эндогенных генах легких цепей (κ) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелых цепей (как описано в примере 1 WO 01/14424), KCo5 трансген κ легкой цепи человека (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)) и HCo7 трансген тяжелой цепи человека (как описано в US 5770429).

Мыши HCo12 несут нарушение JKD в своих эндогенных генах легких цепей (κ) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелых цепей (как описано в примере 1 WO 01/14424), KCo5 трансген κ легкой цепи человека (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)) и HCo12 трансген тяжелой цепи человека (как описано в примере 2 WO 01/14424). У штамма мышей KM эндогенный ген κ легкой цепи мыши был гомозиготно разрушен, как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993) и эндогенный ген тяжелой цепи мыши гомозиготно разрушен, как описано в примере 1 WO 01/09187. Этот мышинный штамм несет трансген κ легкой цепи человека, KCo5, как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Этот мышинный штамм также несет трансхромосому тяжелой цепи человека, состоящую из фрагмента hCF 14-й хромосомы (SC20), как описано в WO 02/43478.

Мыши KM несут трансхромосому тяжелой цепи человека и трансген κ легкой цепи человека. Гены эндогенных тяжелой и легкой цепей мыши также нарушены у KM мышей, так что иммунизация мышей приводит к продукции иммуноглобулинов человека, а не мыши. Конструкция KM мышей и их применение для наработки иммуноглобулинов человека детально описаны в WO 02/43478.

Клетки селезенки таких трансгенных мышей можно применять для получения гибридом, которые секретируют моноклональные антитела человека, согласно хорошо известным техникам. Такие трансгенные млекопитающие, млекопитающие, включающие работающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экспрессию CD38BP, млекопитающие, стабильно трансфицированные одной или более последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CD38, и т.п., являются дополнительным

свойством настоящего изобретения.

Моноклональные или поликлональные антитела человека согласно настоящему изобретению или антитела настоящего изобретения, происходящие из других видов, можно вырабатывать трансгенным способом посредством получения другого млекопитающего, отличного от человека, или растения, которое является трансгенным для рассматриваемых последовательностей тяжелой и легкой цепей, и продукции антитела в форме, пригодной для выделения. В связи с трансгенной продукцией у млекопитающих антитела можно производить и выделять из молока овец, коров или других млекопитающих. См, например, US 5827690, US 5756687, US 5750172 и US 5741957.

Далее антитела человека согласно настоящему изобретению или антитела настоящего изобретения, происходящие из других видов, можно получать с помощью техник дисплея, включая без ограничений, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомальный дисплей и другие техники, хорошо известные в данной области, и получающиеся молекулы можно подвергать дополнительному созреванию, такому как созревание сродства, с помощью техник, хорошо известных в данной области (см., например, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (фаговый дисплей), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (phage display), Hanes and Plucthau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (рибосомальный дисплей), Parmley and Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russet et al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hoogenboom et al., *Immunol. Reviews* 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10, 80-84 (1992), и US 5733743). Если технологии дисплея применяются для продукции антител, которые не являются человеческими, такие антитела можно гуманизировать, например, как описано в настоящей заявке.

Гуманизированные моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получать посредством соединения константных доменов антитела человека с переменными доменами из отличных от человека видов. Примеры того, как получить гуманизированные антитела, можно найти, например, в US 6054297, US 5886152 и US 5877293. Гуманизированное антитело создают так, чтобы получить большую гомологию с иммуноглобулином человека, чем у произведенных из животных моноклональных антител. Аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения из "вносимого" (животного) переменного домена обычно трансфицируют в "скелетную" человека. Гуманизацию, по существу, можно проводить по способу Винтера и соавт. (Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332, 323-327 (1988), Verhoeven et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988)) посредством замещения определяющих комплементарность участков грызуна ("CDRs") или CDR последовательностей на соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, в таких гуманизированных антителах CDR части переменных участков человека замещены соответствующей последовательностью из видов, отличных от человека. Так, гуманизированные антитела являются обычно антителами человека, у которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки каркасного участка замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов. Выбор переменных участков человека как легкого, так и тяжелого, для применения в получении гуманизированных антител является важным для уменьшения антигенности. Согласно так называемому способу "наилучшего согласия" последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу против всей библиотеки известных последовательностей переменного домена человека. Последовательность человека, которая оказывается самой близкой к последовательности грызуна, далее применяют как каркасную последовательность человека (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151, 2296 (1993), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987)). Другой способ применяет отдельную каркасную часть, произведенную из обобщающей типичной последовательности антител человека отдельной подгруппы легкой и тяжелой цепей. Такую же каркасную часть можно применять для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *PNAS USA* 89, 4285 (1992), Presta et al., *J. Immunol.* 151, 2623 (1993)).

Обычно также важно, чтобы гуманизированные антитела сохраняли высокое сродство к антигену и другие благоприятные биологические свойства. Для достижения этой цели гуманизированные антитела можно получать посредством анализа родительских последовательностей и различных отвлеченных гуманизированных продуктов с применением трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина доступны для всех и знакомы специалисту в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и предлагают вероятные трехмерные конформационные структуры последовательностей иммуноглобулина избранных кандидатов. Просмотр этих дисплеев позволяет проанализировать вероятную роль определенных остатков в функционировании последовательности иммуноглобулина кандидата, например анализ остатков, которые оказывают влияние на способность последовательности иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR можно выбирать и комбинировать из последовательностей реципиента и вносимых последовательностей так, чтобы желаемые характеристики антитела, такие как увеличенное сродство к антигену мишени, довести до максимума, хотя именно CDR остатки прямо и наиболее значительно влияют на связывание антигена.

Мышинные антитела или антитела из других видов можно гуманизировать или приматизировать с применением любой подходящей техники, большое число подходящих техник уже хорошо известно в данной области (см., например, Winter and Harris *Immunol. Today* 14, 43-46 (1993) и Wright et al., *Crit. Re-*

views in Immunol. 125-168 (1992)). Данное антитело можно построить с помощью ДНК рекомбинантных техник, чтобы заместить C_H1 , C_H2 , C_H3 , участки связки и/или каркасные домены соответствующими последовательностями человека (см. WO 92/02190 и US 5530101, US 5585089, US 5693761, US 5693792, US 5714350 и US 5777085).

Гуманизацию антител можно также проводить с помощью способа Винтера и соавт. (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988), Verhoeven et al., Science 239, 1534-1536 (1988)) посредством замещения последовательностей CDRs или CDR грызунов соответствующими последовательностями антитела человека. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются, в известном смысле, химерными антителами (US 4816567), где значительно меньше материала, чем интактный вариационный участок человека, замещено соответствующей последовательностью из вида отличного от человека. На практике гуманизированные антитела являются обычно антителами человека, у которых некоторые CDR остатки и, вероятно, некоторые FR остатки замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Также применение кДНК иммуноглобулина для конструкции генов химерного иммуноглобулина известно в данной области техники (см., например, Liu et al., PNAS USA 84, 3439 (1987) и J. Immunol. 139, 3521 (1987)). мРНК выделяют из гибридомы или других клеток, продуцирующих антитело, и применяют для производства кДНК. Рассматриваемые кДНК можно амплифицировать с применением полимеразной цепной реакции с применением специфических праймеров (US 4683195 и US 4683202). Альтернативно, делают библиотеку и проводят скрининг, чтобы выделить нужную последовательность. Последовательность ДНК, кодирующую вариационный участок антитела, далее соединяют с последовательностями константного участка человека. Последовательности константных участков человека (а также вариационных участков) можно найти в Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N. I. H. publication no. 91-3242 и более недавние и относящиеся к делу данные можно найти на <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GenerallInfo.html>. Выбор изотипа обычно направляется желаемыми функциями эффекторов, такими как фиксация комплемента или активность в зависимой от антитела клеточной цитотоксичности. Примерами изотипов являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Любой из константных участков легкой цепи человека, κ или λ , можно применять. Химерное гуманизированное антитело можно затем экспрессировать с помощью общепринятых способов.

CD38BP настоящего изобретения может быть в любой приемлемой форме с точки зрения мультимеризации. Анти-CD38 антитела и фрагменты антител могут быть, по меньшей мере, в гетеротримерной форме, если не в форме более высокой мультимерности, как такие, связанные с IgM антителами. В других вариантах реализации CD38BP может присутствовать в виде димера или мономера. Мономерные CD38BP по настоящему изобретению могут быть, например, модифицированы с помощью любой подходящей техники так, чтобы образовывать мультимерные пептидные композиции.

Если требуется, класс анти-CD38 антител настоящего изобретения можно переключить с помощью известных способов. Например, класс антитела настоящего изобретения, которое исходно принадлежало IgM классу, можно переключить на IgG антитело согласно настоящему изобретению. Далее техники переключения класса можно применять для перевода одного подкласса IgG в другой, например IgG1 в IgG2. Так, эффекторную функцию антител настоящего изобретения можно изменить с применением переключения изотипа, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM антитела для различных терапевтических применений.

В одном варианте реализации антитело настоящего изобретения является IgG1 антителом, например IgG1, κ или IgG1, λ изотипа. В другом варианте реализации антитело настоящего изобретения является IgG3 антителом, например IgG3, κ или IgG3, λ изотипа. В другом варианте реализации антитело настоящего изобретения является IgG4 антителом, например IgG4, κ или IgG4, λ изотипа. В другом варианте реализации антитело настоящего изобретения является IgA1 или IgA2 антителом. В другом варианте реализации антитело настоящего изобретения является IgM антителом.

Анти-CD38 антитела можно получать из библиотек рекомбинантных комбинаторных антител, таких как библиотека scFv фагового дисплея, которые можно строить из V_L и V_H кДНК человека, полученной из мРНК, произведенной из лимфоцитов человека. Способы получения и скрининга таких библиотек известны в данной области. Имеется большое число доступных в продаже наборов для получения библиотек фагового дисплея. Имеются также другие способы и реагенты, которые можно применять для получения и скрининга библиотек дисплея антител (см., например, US 5223409, WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, Fuchs et al., Bio/Technology 9, 1370-1372 (1991), Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85 (1992), Huse et al., Science 246, 1275-1281 (1989), McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990), Griffiths et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993), Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992), Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), Gram et al., PNAS USA 89, 3576-3580 (1992), Garrad et al., Bio/Technology 9, 1373-1377 (1991), Hoogenboom et al., Nuc. Acid. Res. 19, 4133-4137 (1991) and Barbas et al., PNAS USA 88, 7978-7982 (1991)). Подходящие последовательности нуклеиновых кислот V_L и V_H можно отбирать с применением подходящих способов. Например, V_L и V_H нуклеиновые кислоты можно отбирать, применяя способы импринтинга

эпитопа, описанные в WO 93/06213. Библиотеки антител, например scFv библиотеки, можно получать и подвергать скринингу с применением известных и подходящих способов (с пептидами, содержащими CD38 человека в качестве антигена(ов)), как описано, например, в WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990) и Griffiths et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Такие библиотеки антител и другие комбинации CD38BP (библиотеки, объединения и т.д.) являются свойствами настоящего изобретения, которые можно применять терапевтически для предоставления более полного иммунного ответа; в качестве подходов в способах скрининга иммуногенных пептидов, небольших молекул, других анти-CD38 антител (например, с помощью конкурентного анализа) и т.п. и/или в способах диагностики и в композициях (например, иммуноаналитический чип, включающий набор таких антител, при необходимости в связи с другими антителами, можно сделать с помощью стандартных техник). Как только начальные сегменты V_L и V_H человека отобраны, можно проводить эксперименты "смесь и соответствия", в которых разные пары исходно выбранных V_L и V_H сегментов подвергают скринингу на связывание CD38-содержащих пептидов, чтобы отобрать нужные комбинации V_L/V_H пар. Например, реактивность пептидов можно определять с помощью ELISA и других подходящих способов анализа эпитопа (см., например, instance Scott, J.K. and Smith, G.P. *Science* 249, 386-390 (1990), Cwirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Felici et al., *J. Mol. Biol.* 222, 301-310 (1991) и Kuwabara et al., *Nature Biotechnology* 15, 74-78 (1997) для обсуждения таких техник и принципов). Антитела можно отбирать по их сродству к антигену и/или кинетикам диссоциации их комплекса с антигеном (см., например, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226, 889-896 (1992)).

Чтобы еще улучшить качество и/или разнообразие анти-CD38 антител, V_L и V_H сегменты V_L/V_H пар(ы) можно подвергать случайным мутациям, например, внутри CDR3 участка V_H и/или V_L в процессе, аналогичном процессу соматических мутаций *in vivo*, ответственному за созревание сродства антител при развитии природного иммунного ответа. Такое созревание сродства *in vitro* можно получить посредством амплификации участков V_H и V_L с применением праймеров, комплементарных V_H CDR3 или V_L CDR3, соответственно, причем праймеры обычно "обогащены" произвольной смесью четырех нуклеотидных оснований по определенным положениям, так что получающиеся продукты ПЦР кодируют V_H и V_L сегменты, в которых случайные мутации введены в V_H и/или V_L CDR3 участки. Такие случайным образом мутированные V_H и V_L сегменты можно повторно подвергнуть скринингу на связывание CD38-содержащих пептидов.

После скрининга нуклеиновые кислоты, кодирующие выбранное антитело, можно выделить из смеси дисплея (например, из фагового генома) и субклонировать в подходящий вектор с помощью стандартных техник рекомбинантных ДНК. Если требуется, с такими кодирующими антитело нуклеиновыми кислотами можно работать далее, чтобы создать другую форму антитела или CD38BP. Для экспрессии рекомбинантного антитела, выделенного с помощью скрининга из комбинаторной библиотеки, обычно нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, кодирующую антитело, клонируют в рекомбинантный экспрессирующий вектор и вводят в подходящие клетки хозяина (клетки млекопитающих, клетки дрожжей и т.д.) в условиях, нужных для экспрессии нуклеиновой кислоты и продукции антитела.

Пептиды антитела с высоким сродством, например одноцепочечные фрагменты антитела человека Fv (scFv) и Fab, также можно выделять из таких библиотек с помощью техник намывки/лотка, в которых нужный антиген иммобилизован на твердой поверхности, такой как пластины микрофильтра или бусины (см., например, Barbas and Burton, *Trends. Biotechnol.* 14, 230-234 (1996) и Aujame et al., *Hum. Antibodies* 8, 155-68 (1997). Фаговый дисплей больших простых библиотек также делает возможным изоляцию антител человека непосредственно без иммунизации (см., например, de Haard et al., *J. Biol. Chem.* 274(26), 18218-18230 (1999)).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает вариант анти-CD38 антител. "Вариант" анти-CD38 антитела является антителом, которое отличается от родительского антитела (обычно полученного посредством иммунизации) изменением одного или более нужного аминокислотного остатка, которым является замещение, делеция, вставка или добавление терминальных последовательностей в участках CDR или других V_H и/или V_L последовательностей (предоставленных так, чтобы значительная часть эпитоп-связывающих характеристик родительского антитела сохранялась, если не улучшалась, посредством таких изменений).

Вариации вариантов антитела можно сделать в каждом из каркасных участков, константном домене и/или варибельных участках (или одном или более CDR) у одного варианта антитела. Альтернативно, вариации можно делать только в одном из каркасных участков, варибельных участков (или единственном CDR) или в константном домене антитела. Технику мутагенеза путем аланинового сканирования, как описано в Cunningham and Wells, *Science* 244, 1081-1085 (1989), можно применять для идентификации остатков, подходящих для замещения или делеции при получении нужных вариантов CD38BP, включающих вариант V_L , V_H или отдельных CDR последовательностей, хотя также можно применять другие подходящие техники мутагенеза. Множественные замещения аминокислот также можно проводить и тестировать с помощью известных способов мутагенеза и скрининга, например, как раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer, *Science* 241, 53-57 (1988) или Bowie and Sauer, *PNAS USA* 86, 2152-2156 (1989).

Так, например, у варианта антитела один или более аминокислотный остаток можно ввести или вставить или присоединить к одному или более гиперварибельному участку родительского антитела,

например, одному или более CDR. Вариант анти-CD38 антитела может включать любое число вставленных аминокислотных остатков, предоставленных опять так, чтобы, по меньшей мере, значительная часть эпитоп-связывающих характеристик родительского антитела сохранилась. Вариант анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению может, например, включать от приблизительно 1-30 вставленных аминокислотных остатков, например от приблизительно 1-10, например от приблизительно 2-10, например от приблизительно 2-5, например от приблизительно 1-5 вставленных аминокислотных остатков. Сходным образом, вариант анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению может, например, включать от приблизительно 1-30 deletированных аминокислотных остатков, например от приблизительно 1-10, например от приблизительно 2-10, например от приблизительно 2-5, например от приблизительно 1-5 deletированных аминокислотных остатков. Сходным образом, вариант анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению может, например, включать от приблизительно 1-30 замещенных аминокислотных остатков, например от приблизительно 1-10, например от приблизительно 2-10, например от приблизительно 2-5, например от приблизительно 1-5 замещенных аминокислотных остатков. Сходным образом, вариант анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению может, например, включать от приблизительно 1-30 добавлений аминокислотных остатков терминальной последовательности, например от приблизительно 1-10, например от приблизительно 2-10, например от приблизительно 2-5, например от приблизительно 1-5 добавлений аминокислотных остатков терминальной последовательности. Вариант антитела согласно настоящему изобретению может также включать комбинацию двух или более таких вставок, делеций и добавлений аминокислотных остатков терминальной последовательности, предоставленных так, что вариант обладает, по меньшей мере, значительной частью родства, специфичности и/или избирательности родительских антител по отношению к одному или более CD38 эпитопу.

Соображения при выборе вариантов антитела (например, сохранение функциональных характеристик аминокислотных остатков, сохранение характеристик гидропатичности аминокислотных остатков и/или сохранение размера/веса аминокислотных остатков) описаны в настоящей заявке в других местах. Обычно изменения аминокислотной последовательности, например вариации консервативных замещений, по возможности, не должны значительно менять структурные характеристики родительской последовательности (например, замена аминокислоты не должна приводить к нарушению вторичной структуры, которая характеризует функцию родительской последовательности). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептида описаны, например, в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)), *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al., *Nature* 354, 105 (1991). Дополнительные принципы, относящиеся к созданию и конструкции вариантов пептидов, обсуждаются, например, в Collinet et al., *J. Biol. Chem.* 275(23), 17428-33 (2000).

Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получить с помощью введения подходящих изменений нуклеотидов в кодирующую антитело нуклеиновую кислоту (например, с помощью направленного мутагенеза) или посредством химического синтеза пептида. Такие варианты включают, например, делеции из и/или вставки в и/или замещения и/или добавления терминальных последовательностей остатков в аминокислотных последовательностях антител приведенных в настоящей заявке примеров. Можно проводить любую комбинацию делеций, вставок и замещений, чтобы получить нужный вариант, предоставленный так, что вариант обладает, по меньшей мере, значительной частью эпитоп-связывающих характеристик родительского антитела. Изменения аминокислотной последовательности по отношению к родительскому антителу могут также менять пост-трансляционный процессинг вариантов антитела по сравнению с родительским антителом, например, посредством изменения числа или положения участков гликозилирования.

Варианты антител согласно настоящему изобретению могут включать изменения в гипервариабельном участке, например в участках CDR. Примеры CD38BP, включающие такие CDR варианты, описаны в настоящей заявке в другом месте, и, как описано выше, такие CD38BP могут быть антителами.

Варианты антител согласно настоящему изобретению могут включать изменения каркасных участков (FR), которые находятся вне гипервариабельных участков, например, в Fc участке, где изменения могут быть связаны с благоприятными свойствами, например изменением функциональных и фармакокинетических свойств антител. Например, замещение или другая модификация (вставка, делеция, добавления терминальной последовательности или их комбинация) в каркасном участке или константном домене могут быть связаны с увеличением времени полужизни варианта антитела по сравнению с родительским антителом, или могут быть сделаны для изменения иммуногенности варианта антитела по сравнению с родительским антителом, для предоставления участка для ковалентного или нековалентного связывания другой молекулы, или для изменения такого свойства, как фиксация комплемента, например, приводя к уменьшению или увеличению связывания C1q и CDC или FcγR и зависящей от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC). Замещения могут быть сделаны, например, по одному или более аминокислотному остатку 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 константного участка тяжелой цепи, таким образом обуславливая изменение эффекторной функции при сохранении связывания с антигеном по сравнению с немодифицированным антителом, US 5624821 и US 5648260. Далее можно сослаться на

WO 00/42072, раскрывающий антитела с измененными Fc участками, что приводит к увеличению ADCC, и WO 94/29351, раскрывающее антитела с мутациями в N-концевом участке домена C_H2, которые изменяют способность антител связываться с FcR1 и поэтому уменьшают способность антител связываться с C1q, что в свою очередь приводит к уменьшению способности антител фиксировать комплемент. Далее Shields et al., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604 (2001) показывают комбинированные варианты с улучшенным связыванием FcγRIII, например T256A/S298A, S298A/E333A и S298A/E333A/K334A.

Время полужизни антител *in vivo* также можно улучшить посредством модификации эпитопа спасательного рецептора константного участка иммуноглобулина или иммуноглобулинподобного константного домена, так что молекула не включает интактный C_H2 домен или интактный Ig Fc участок, см. US 6121022 и US 6194551. Время полужизни *in vivo* можно еще увеличить, проводя мутации Fc участка, например, посредством замещения треонином лейцина в положении 252, треонином серина в положении 254 и треонином фенилаланина в положении 256, см. US 6277375.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает варианты анти-CD38 антител, где потенциальные эпитопы Т-клеток у антитела уменьшены или удалены с помощью рационального конструирования. Так, например, в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает "деиммунизированное" анти-CD38 антитело, у которого потенциальные эпитопы Т-клеток удалены. Создание и конструкцию деиммунизированных анти-CD38 антител можно осуществить с помощью любой подходящей техники (см., например, WO 9852976 относительно способов получения деиммунизированных антител). Ожидается, что иммуногенность у человека устраняется или существенно уменьшается, когда такие CD38BP (например, вариант анти-CD38 антитела) назначают согласно настоящему изобретению.

Другие мутации каркасных участков могут включать изменения последовательности, которые могут уменьшать подверженность протеолизу, уменьшать подверженность окислению и/или придавать или модифицировать другие физико-химические или функциональные свойства данного варианта антитела.

Вариации аминокислотной последовательности в каркасных участках могут также приводить к измененному профилю гликозилирования у варианта антитела относительно родительского антитела. Под изменением подразумевается устранение одного или более углеводородного звена, обнаруживаемого у родительского антитела, и/или добавление одного или более участка гликозилирования, которые отсутствовали у родительского антитела. Гликозилирование антител, обычно, является либо N-опосредованным, либо O-опосредованным. N-опосредованное относится к присоединению углеводородного звена к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х является любой аминокислотой кроме пролина, являются распространенными последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводородного звена к боковой цепи аспарагина. Так, присутствие у полипептида любой из этих трипептидных последовательностей может создать потенциальный участок гликозилирования. O-опосредованное гликозилирование относится к присоединению таких сахаров, как N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза к гидроксиминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин также могут применяться. Добавление участков гликозилирования можно легко произвести посредством изменения аминокислотной последовательности так, что она содержит одну или более вышеописанную трипептидную последовательность (для N-опосредованных участков гликозилирования). Изменение можно также сделать посредством добавления и/или замещения одним или более остатком серина или треонина последовательности исходного антитела (для O-опосредованных участков гликозилирования).

Антитела можно также экспрессировать в трансфектоте, которая не добавляет единицу фукозы, обычно присоединенную к углеводороду, соединенному с аспарагином в положении 297 Fc, для того чтобы увеличить сродство Fc к FcγRIII, что в свою очередь приведет к увеличению ADCC антител в присутствии NK-клеток, см. Shield et al., J. Biol. Chem. 277, 26733 (2002). Другие способы модификации гликозилирования, сфокусированные на фукозилировании, описаны в WO 00/61739 у Kyowa. Далее можно проводить модификацию галактозилирования, чтобы модифицировать CDC. Далее можно сослаться на WO 99/54342 и Umana et al., Nat. Biotechnol. 17, 176 (1999), раскрывающие линию клеток CHO, созданную для экспрессии GntIII, что приводит к экспрессии моноклональных антител с измененными гликоформами и улучшенной активностью ADCC.

Другие потенциально пригодные подходы к получению новых анти-CD38 антител включают мутагенез "прогулка по CDR" (walking), перетасовку (shuffling) цепи антитела, "экономный мутагенез" ("parsimonious mutagenesis") (Balint and Larrick, Gene 137, 109-118 (1993)), и другие техники созревания сродства (см. например, Wu et al., PNAS USA 95, 6037-42 (1998)). Процедуры клонирования набора (Repertoire) можно применять для получения вариантов антител (см., например, WO 96/33279).

Имеется большое число техник, известных для получения CDR вариантов, любую подходящую технику или их комбинацию можно применять в контексте настоящего изобретения для получения CDR вариантов участков CDR антител примеров. Примеры таких техник включают удаление несущественных остатков, как описано в Studnicka et al., Protein Engineering 7, 805-814 (1994) (см. также Soderlind et al., Immunotechnology. 4(3-4), 279-85 (1999), перемещающийся мутагенез CDR и другие техники искусствен-

ного созревания сродства (см., например, Yang et al., *Journal of Molecular Biology* 254(3). 392-403 (1995), техники смешивания (shuffling) CDR, где обычно амплифицируют CDR с набором разнообразных генов матриц при необходимости включающих синтетические олигонуклеотиды, константные участки V_L , V_H и/или CDR амплифицируются и различные фрагменты смешиваются (в виде одноцепочечных или двухцепочечных фрагментов) и объединяются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с получением набора генов продуктов, кодирующих фрагменты антител, несущие перемешанные CDR, вставленные в заданный каркас, которые амплифицируют с применением внешних праймеров, прилегающих к участкам вне внесенных участков рестрикции для обеспечения продукции полноразмерных продуктов, которые вставляют в выбранный вектор и применяют для экспрессии белков, содержащих варианты CDR. Нужные структуры можно определить посредством наложения вариант/подражающих структур и структур родительских последовательностей, например посредством сравнения структур, полученных с помощью ЯМР. Полезные способы рационального конструирования вариантов CDR последовательностей описаны, например, в WO 91/09967 и WO 93/16184. Дополнительные примеры таких способов представлены в настоящей заявке в других местах.

Настоящее изобретение также предоставляет фрагменты антител (включая варианты антител) согласно настоящему изобретению, где фрагменты обладают способностью связываться с CD38 (CD38-связывающие фрагменты). CD38BP таким образом включают подобные антителу молекулы, которые включают менее чем полную тетрамерную структуру, связанную с антителами, встречающимися в природе. Фрагмент антитела может быть любым пептидом, который включает часть или полноразмерное антитело, по существу, антиген-связывающий или вариабельный участок его (это включает, например, фрагменты гуманизированных антител, включающие CDR антитела настоящего изобретения, их варианты или другие CDR, которые позволяют фрагменту антигена конкурировать с антителом настоящего изобретения за связывание CD38). В одном варианте реализации фрагмент относится к пептиду, который состоит, по существу, только из части молекулы антитела. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фрагмент антитела, включающий по меньшей мере часть вариабельного домена тяжелой цепи, включающего один или более V_H CDR антитела настоящего изобретения и при необходимости также вариабельный домен легкой цепи, включающий один или более V_L CDR антитела настоящего изобретения, где вариабельный домен тяжелой цепи и при необходимости вариабельный участок легкой цепи, при необходимости, является (являются) соединенными с дополнительным звеном, например константным доменом иммуноглобулина. Последовательности константного участка можно добавить к последовательности(ям) тяжелой цепи и/или легкой цепи с образованием видов с частичной длиной тяжелой и/или легкой цепи(ей). Константные участки или их части любого изотипа антитела можно применять для этой цели, включая константные участки IgG, IgM, IgA, IgD и IgE.

Примеры CD38-связывающих фрагментов антител включают Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv фрагменты. Фрагмент антитела в контексте настоящего изобретения может также включать пептид, содержащий CDR, и т.п. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фрагмент антитела, включающий первую полипептидную цепь, которая включает любой из CDR тяжелой цепи, описанный в настоящей заявке, и вторую полипептидную цепь, которая включает любой из CDR легкой цепи, описанный в настоящей заявке, причем две полипептидные цепи ковалентно связаны посредством одной или более межцепочечных дисульфидных связей. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает двухцепочечный фрагмент антитела, обладающий такими свойствами, где фрагмент антитела выбирают из фрагментов Fab, Fab', Fab'-SH, Fv и/или $F(ab')_2$.

Антитела можно фрагментировать с применением общепринятых техник и фрагменты подвергать скринингу на применимость таким же способом, как описано выше для целых антител. Например, фрагменты $F(ab')_2$ можно получать посредством обработки антитела пепсином. Получившийся фрагмент антитела можно обрабатывать с восстановлением дисульфидных связей для получения фрагментов Fab'. Fab фрагменты можно получать посредством обработки IgG антитела папаином; Fab' фрагменты можно получать с помощью переваривания пепсином IgG антитела. Fab' фрагмент можно также получать посредством связывания Fab', описанного ниже, через тиоэфирную связь или дисульфидную связь. Fab' фрагмент является фрагментом антитела, полученным посредством разрезания дисульфидной связи участка связки (hinge) в $F(ab')_2$. Fab' фрагмент можно также получить посредством обработки $F(ab')_2$ фрагмента восстанавливающим агентом, например дитиотрейтолом. Пептиды фрагмента антитела можно также получить с помощью экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть $F(ab')_2$ фрагмента может включать последовательности ДНК, кодирующие C_H1 домен и участок связки тяжелой цепи с последующим стоп-кодоном с получением усеченной молекулы фрагмента антитела.

CD38BP также включают одновалентные антитела и одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела являются пептидами, в которых Fv участки тяжелой и легкой цепи связаны. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает одноцепочечный Fv (scFv), где тяжелая и легкая цепи у Fv анти-CD38 антитела по настоящему изобретению соединены гибким пептидным линкером (обычно, из приблизительно 10, 12, 15 или более аминокислотных остатков) в единственной цепи пептида. спосо-

бы получения таких антител описаны, например, в US 4946778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) и McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990).

Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если только один V_H и V_L участок применяются, двухвалентным, если применяются два V_H и V_L участка, или поливалентным, если применяется более двух V_H и V_L участков.

В одном варианте реализации настоящего изобретения CD38BP можно дериватизировать или связать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, Fab' фрагментом) для получения биспецифичной или мультиспецифичной молекулы, которая связывается с множественными участками связывания эпитопов мишени. Например, антитело настоящего изобретения может быть функционально связано (например, с помощью химического сопряжения, генетического соединения, нековалентной связи или т.п.) с одной или более связывающими молекулами, например антителом, пептидом или связывающим миметиком. В одном варианте реализации CD38BP является антителом настоящего изобретения.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает биспецифичные и мультиспецифичные молекулы, включающие по меньшей мере одну первую специфичность связывания с CD38 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом мишени. В одном варианте реализации настоящего изобретения второй эпитоп мишени является Fc рецептор, например FcγR1 рецептор человека (CD64), или Fcα рецептор человека (CD89), или рецептор Т-клеток, например CD3. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает биспецифичные и мультиспецифичные молекулы, способные связываться как с FcγR, FcαR, так и с FcεR экспрессирующими эффекторными клетками (например, моноцитами, макрофагами или полиморфоядерными клетками (PMNs)) и клетками мишени, экспрессирующими CD38. Эти биспецифичные и мультиспецифичные молекулы нацеливают CD38-экспрессирующие клетки на эффекторные клетки и приводят в действие активности эффекторных клеток, опосредованные Fc рецептором, например фагоцитоз CD38-экспрессирующих клеток, зависимость от антител клеточную цитотоксичность (ADCC), высвобождение цитокинов или генерацию аниона супероксида.

Биспецифичные и мультиспецифичные молекулы согласно настоящему изобретению могут далее включать третью специфичность связывания в дополнение к специфичности анти-Fc связывания и специфичности анти-CD38 связывания. В одном варианте реализации третья специфичность связывания является частью против фактора усиления (EF), например молекулой, которая связывается с белком поверхности, участвующим в цитотоксической активности, и таким образом увеличивает иммунный ответ против клеток мишени. "Часть против фактора усиления" может быть антителом, функциональным фрагментом антитела или лигандом, который связывается с данной молекулой, например, антигеном или рецептором и таким образом приводит к усилению эффекта связывания детерминант для Fc фактора или антигена клетки мишени. "Часть против фактора усиления" может связываться с Fc рецептором или антигеном клетки мишени. Альтернативно, "часть против фактора усиления" может связываться с единицей, отличной от единицы, с которой связываются первая и вторая специфичности. Например, "часть против фактора усиления" может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 или другие иммунные клетки, что приводит к увеличенному иммунному ответу против клетки мишени).

В одном варианте реализации биспецифичные и мультиспецифичные молекулы по настоящему изобретению включают в качестве специфичности связывания по меньшей мере еще одно антитело, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Далее антитело может также быть димером легких цепей или тяжелых цепей, или любым наименьшим их фрагментом, например Fv или одноцепочечной конструкцией, как описано в Ladner et al., в US 4946778. Антитело также может быть составным белком со связывающим доменом иммуноглобулина, как описано в US 2003/0118592 и US 2003/0133939.

В одном варианте реализации специфичность связывания для Fc рецептора предоставлена моноклональным антителом человека, связывание которого не блокируется иммуноглобулином G человека (IgG). Как применяется в настоящей заявке, термин "IgG рецептор" относится к любому из восьми генов γ-цепи, расположенных на хромосоме 1. Эти гены кодируют в общей сложности двенадцать трансмембранных или растворимых изоформ рецептора, которые объединены в три класса Fc* рецепторов: RFcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). В одном варианте реализации Fcγ рецептор является RFcγRI человека с высоким родством. Получение и описание таких моноклональных антител описана в Fanger et al., в WO 88/00052 и в US 4954617. Такие антитела связываются с эпитопом RFcγRI, FcγRII или FcγRIII на участке, который отличается от Fcγ связывающего участка рецептора, и таким образом, их связывание не блокируется в значительной степени физиологическими уровнями IgG. Специфические анти-RFcγRI антитела, применяемые в настоящем изобретении, являются mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. В других вариантах реализации анти-RFcγRI рецепторное антитело является гуманизированной формой mAb 22 (H22). Продукция и характеристика антитела H22 описаны в Graziano, R.F. et al., *J. Immunol.* 155(10), 4996-5002 (1995) и WO 94/10332. Клеточная линия, продуцирующая антитело H22,

положена на хранение в Коллекцию культур американского типа (American Type Culture Collection) 4 ноября 1992 г. под названием HA022CL1 и номером No. CRL 11177.

В одном варианте реализации специфичность связывания Fc рецептора предоставлена антителом, которое связывает IgA рецептор человека, например Fc α рецептор (Fc α I (CD89), связывание которого в одном варианте реализации не блокируется иммуноглобулином A человека (IgA). Термин "IgA рецептор" включает продукт одного α -гена (Fc α RI), расположенного на хромосоме 19. Известно, что этот ген кодирует несколько трансмембранных изоформ с альтернативным сплайсингом от 55 до 110 кДа. Fc α RI (CD89) экспрессируется конститутивно у моноцитов/макрофагов, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, но не в неэффекторной популяции клеток. Fc α RI обладает средним сродством как к IgA1, так и к IgA2, которое возрастает под действием цитокинов, например G-CSF или GM-CSF (Morton, H.C. et al., *Critical Reviews in Immunology* 16, 423-440 (1996)). Описаны четыре Fc α RI-специфических моноклональных антитела, идентифицированные как A3, A59, A62 и A77, которые связывают Fc α RI вне домена связывания IgA лиганда (Monteiro, R.C. et al., *J. Immunol.* 148, 1764 (1992)).

Fc α RI, RFc γ RI, RFc γ RII и RFc γ RIII, особенно RFc γ RII и RFc γ RIII, являются примерами запускающих (триггерных) рецепторов для применения в настоящем изобретении, поскольку они (1) первично экспрессируются на иммунных эффекторных клетках, например моноцитах, PMN клетках, макрофагах и древоидных клетках; (2) экспрессируются на высоких уровнях (например, 5000-100000 на клетку); (3) являются медиаторами цитотоксических активностей (например, ADCC, фагоцитоза) и (4) опосредуют усиленную презентацию антигенов, включая собственный антиген нацеливания на них.

В одном варианте реализации CD38BP настоящего изобретения является мультиспецифичным анти-CD38 антителом или подобной антителу молекулой, частным примером которого является биспецифичное антитело, включающее по меньшей мере одну пару V_H последовательности и V_L последовательности цепей, специфичных для одного эпитопа, включенного, по меньшей мере, отчасти в CD38 и по меньшей мере одну пару V_H последовательности и V_L последовательности цепей, специфичных для второго эпитопа. V_H и V_L последовательности биспецифичного антитела могут включать полные V_H и V_L последовательности, соответствующие участкам V_H и V_L анти-CD38, варианты V_H и/или V_L последовательностей или необходимые части V_H и/или V_L участков, например нужную комбинацию CDR последовательностей и других последовательностей, достаточных для предоставления связывания с нужными эпитопами.

Примеры молекул биспецифичного антитела включают (1) два антитела, одно со специфичностью к CD38 и другое к второй мишени, которые связаны вместе, (2) одиночное антитело, у которого одна цепь специфична к CD38 и вторая цепь специфична к второй молекуле, и (3) одноцепочечное антитело, обладающее специфичностью к CD38 и к второй молекуле. Обычно вторая мишень/вторая молекула является молекулой, отличной от CD38. В одном варианте реализации вторая молекула является раковым антигеном/связанным с опухолью антигеном, таким как карциноэмбриональный антиген (CEA), антиген, специфичный для простаты (PSA), RAGE (почечный антиген), α -фетопротеин, CAMEL (CTL-узнаваемый антиген меланомы), CT антигены (например, MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 и D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE и SAGE), мышинные антигены (например, MUC1, муцин-CA125 и т.д.), ганглиозидные антигены, тирозиназа, gp75, C-мыс, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7 и Er-CAM. В одном варианте реализации вторая молекула является связанным с раком интегрином, например интегрином $\alpha 5 \beta 3$. В одном варианте реализации вторая молекула является ангиогенным фактором или другим связанным с раком фактором роста, например васкулярно-эндотелиальным фактором роста (VEGF), фактором роста фибробластов (FGF), эпидермальным фактором роста (EGF), рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), ангиогенином и их рецепторами, в частности рецепторами, связанными с развитием рака (например, одним из HER1-HER4 рецепторов). Другие белки, связанные с развитием рака, обсуждаемые в настоящей заявке, могут также быть подходящей второй молекулой. В одном варианте реализации вторая молекула является молекулой, экспрессируемой на поверхности клеток множественной миеломы, такая как CD138.

В одном варианте реализации биспецифичное антитело настоящего изобретения является диателом.

Биспецифичные антитела также включают сшитые или "гетероконъюгированные" антитела. Например, одно из антител гетероконъюгата может быть сопряжено с авидином и другое с биотином. Предполагается, что такие антитела, например, направляют клетки иммунной системы на нежелательные клетки (см., например, US 4676980). Антитела гетероконъюгаты можно получать с применением любого общеизвестного способа сшивки. Подходящие агенты для сшивания пептидов и соответствующие техники хорошо известны в данной области и примеры таких агентов и техник раскрыты, например, в US 4676980.

Так, хотя обсуждение в настоящей заявке может фокусироваться на антителах, следует понимать, что варианты и свойства антител можно равным образом прилагать к фрагментам антител, например Fab фрагментам, Fab' фрагментам и scFv пептидам, антителоподобным пептидам (пептидам, включающим CDR), би- и мультиспецифичным антителам и другим CD38BP, если потребуется, предоставленным так, что CD38BP настоящего изобретения сохраняет, по меньшей мере, значительную часть антиген-

связывающих свойств соответствующего полного антитела. В некоторых случаях фрагменты антител могут обладать более низким сродством связывания антигена, но могут предлагать другие благоприятные свойства, которые могут возместить такую потерю сродства.

CD38BP настоящего изобретения и в особенности анти-CD38 антитела можно отбирать на основе того, могут ли они предоставить способность к фиксации комплемента или нет. Имеется большое число изотипов антител, которые способны к фиксации комплемента и CDC, включая, но не ограничиваясь этим, следующие: мышинный IgM, мышинный IgG2a, мышинный IgG2b, мышинный IgG3, IgM человека, IgG1 человека и IgG3 человека. Такие изотипы, которые не включают, не ограничиваясь этим, IgG2 человека и IgG4 человека. Определение изотипа и другие способы модификации фиксации комплемента и CDC функциональные характеристики антител известны в данной области.

CD38BP настоящего изобретения также включают иммуноадгезины, которые являются молекулами, где один или более из CDR анти-CD38 антитела ковалентно или нековалентно связан с молекулой. Иммуноадгезин может включать CDR в качестве части большей полипептидной цепи, может ковалентно связывать CDR с другой полипептидной цепью, или может включать CDR нековалентно. CDR позволяют иммуноадгезину специфически связываться с CD38.

Настоящее изобретение также предоставляет CD38BP составные белки. CD38BP составные белки могут включать любую подходящую аминокислотную последовательность или комбинацию последовательностей, которые являются специфичными и/или избирательными по меньшей мере для одного домена, который, по меньшей мере, отчасти включен в CD38 (например, V_H домен, V_L домен анти-CD38 антитела или, в частности, их CDR) и по меньшей мере одну негомологию и обычно неблизкую аминокислотную последовательность (обладающие, например, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 35%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 25%, менее чем приблизительно 20% идентичности с последовательности аминокислот последовательности, специфичной/избирательной по CD38), что придает детектируемую биологическую функцию или характеристику составному белку, которую нельзя приписать только последовательности, специфичной/избирательной по CD38 (например, увеличенное время полужизни *in vivo*, флуоресценция, увеличенное нацеливание на определенный тип клеток и т.д.). Функциональные последовательности такого составного белка могут быть разделены гибким линкером(ами). Вторичная последовательность(и) может также быть произведена из цитотоксических или апоптических пептидов. Вторичные последовательности могут также придавать диагностические свойства. Примеры таких последовательностей включают таковые, произведенные из легко отслеживаемых ферментов, например пероксидазы хрена.

CD38BP составные белки можно также характеризовать с помощью включения дополнительной эпитопной метки. Последовательность эпитопной метки является аминокислотной последовательностью, обладающей достаточным количеством остатков для предоставления эпитопа, против которого можно получить антитела, в контексте CD38BP еще и достаточно короткая, так, чтобы, по существу, не мешать активности (избирательности, специфичности, сродству и/или биологической активности) CD38BP (по сравнению с родительским CD38BP, лишенным эпитопной метки). Эпитоп-хвостик, желательным, является достаточно уникальным, чтобы антитела к эпитопной метке не проявляли значительной перекрестной реактивности с другими эпитопами. Подходящие для эпитопной метки полипептиды обычно имеют по меньшей мере около шести аминокислотных остатков и обычно между приблизительно 8-50 аминокислотными остатками (например, приблизительно 9-30 остатков). Примеры эпитопной метки включают полипептидную метку HA вируса гриппа и его антитело 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2159-2165 (1988)); с-мус таг и его антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12), 3610-3616 (1985)), таг гликопротеина D (gD) герпеса простого и его антитело (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547-553 (1990)). В определенных вариантах реализации эпитопная метка является "спасательным эпитопом связывания рецептора". Как применяется в настоящей заявке, термин "спасательный эпитоп связывания рецептора" относится к эпитопу Fc участка IgG молекулы (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение полужизни молекулы IgG в сыворотке *in vivo*.

CD38BP настоящего изобретения также включают производные CD38BP. Производным является пептид, у которого один или более аминокислотный остаток пептида химически модифицирован (например, посредством алкилирования, ацилирования, образования сложного эфира, образования амида) или ковалентно связан с одним или более гетерологичным заместителем (например, липофильным заместителем группой полиэтиленгликоля (ПЭГ), пептидной боковой цепью, связанной с подходящим органическим звеном, линкером и т.д.). Пептид может также быть конъюгирован с терапевтическим звеном, например цитотоксином, химиотерапевтическим лекарством, иммуносупрессантом или радиоизотопом (так называемый иммуноконъюгат). По существу, CD38BP, описанный в настоящей заявке, можно модифицировать посредством включения любого подходящего числа таких модифицированных аминокислот и/или связей с такими конъюгированными заместителями. Пригодность в данном контексте, по существу, определяется способностью, по меньшей мере, по большей части сохранять CD38 избирательность и/или специфичность, присущие недериватизированному родительскому CD38BP. Включение одной или более модифицированных аминокислот может давать преимущества, например, (а) увеличение полужизни пептида в сыворотке, (б) уменьшение антигенности полипептида или (в) увеличение способ-

ности полипептида к хранению. Аминокислота(ы) модифицируют, например, во время трансляции или после трансляции в течение продукции рекомбинант (например, N-опосредованное гликозилирование по N-X-S/T мотиву при экспрессии в клетках млекопитающих) или модифицируют синтетическими способами. Неограничивающие примеры модифицированных аминокислот включают гликозилированную аминокислоту, сульфатированную аминокислоту, пренилированную аминокислоту (например, фарнезилированную, геранилгеранилированную) аминокислоту, ацетилованную аминокислоту, ацилированную аминокислоту, ПЭГилированную аминокислоту, биотинилированную аминокислоту, карбоксилированную аминокислоту, фосфорилированную аминокислоту и т.п. Литература переполнена ссылками, достаточными для наставления специалиста в данной области при модификации аминокислот. Примеры протоколов находятся в in Walker (1998) Protein Protocols On Cd-Rom, Humana Press, Towata, N.J. Модифицированные аминокислоты можно выбирать из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной, аминокислоты, ацетилованной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим агентом.

Дополнительно антитела можно модифицировать химически посредством ковалентной конъюгации с полимером, чтобы, например, увеличить их циркуляторное время полужизни. Примеры полимеров и способов присоединения к ним проиллюстрированы, например, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. Дополнительные иллюстративные примеры включают полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярным весом между приблизительно 1000 и приблизительно 40000, например между приблизительно 2000 и приблизительно 20000, например между приблизительно 3000 и приблизительно 12000).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, которое конъюгировано со второй молекулой, которая выбрана из радиоизотопа, фермента, субстрата фермента, кофактора, флуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, пептидного тага или магнитной частицы. В одном варианте реализации CD38BP может быть конъюгирован с одним или более фрагментом антитела, нуклеиновыми кислотами (олигонуклеотидами), нуклеазами, гормонами, иммуномодуляторами, хелаторами, соединениями бора, фотоактивными агентами, красителями и т.п. Эти и другие подходящие агенты можно соединять прямо или непрямо с CD38BP согласно настоящему изобретению. Одним примером непрямого соединения второго агента является соединение через звено разделителя. Такие разделители в свою очередь могут быть нерастворимыми или растворимыми (см. например, Diener et al., Science 231, 148 (1986)) и могут выбираться, чтобы позволить высвобождение лекарства из CD38BP на участке мишени и/или при определенных условиях. Дополнительные примеры терапевтических агентов, которые могут быть соединены с CD38BP, включают лектины и флуоресцентные пептиды.

В одном варианте реализации предоставлены производные CD38BP, включающие одну или более аминокислоту, меченую радиоизотопом. Меченое радиоизотопом CD38BP можно применять как с диагностическими, так и с терапевтическими целями (конъюгация с радиоактивными молекулами является другим возможным свойством). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются этим, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I и ^{186}Re . Способы получения радиоактивно меченых аминокислот и относящиеся к этому производные полипептидов известны в данной области (см. например, Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafher and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и US 4681581, US 4735210, US 5101827, US 5102990 (US RE35,500), US 5648471 и US 5697902. Например, радиоактивные изотопы могут быть присоединены способом с хлорамином T.

Предпочтительными радиоизотопами для диагностики являются изотопы индия и для терапевтических приложений изотопы иттрия, которые являются цитотоксичными. Радиоизотопы, испускающие протон, по существу, являются предпочтительными в диагностике (способы радиоиммуносцинтиграфии (RIS)). У электронов Оже очень короткая длина пробега (5-10 нм) и они должны быть интернализированы, чтобы быть цитотоксичными (см. например, Adelstein et al., Nucl. Med. Biol. 14, 165-169 (1987)). Соответственно, пептиды, конъюгированные с такими радиоизотопами, могут быть полезными для диагностических способов, но только интернализированные пептиды можно рассматривать для применения с радиоизотопами, испускающими электроны Оже, в целях терапии. α -Частицы должны испускаться близко к клетке (в пределах 3-4 диаметров клетки), чтобы быть эффективными в качестве терапевтических агентов (Vriesendorp et al., "Radioimmunoglobulin therapy," in High Dose Cancer Therapy Armitage et al., (eds). (Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 1992)). Предполагается, что излучатели как электронов Оже, так и α -частиц должны обладать высокой избирательностью, поскольку их излучение с коротким пробегом не будет облучать соседние нераковые клетки.

Радиоактивные металлы ^{111}In и ^{90}Y являются, соответственно, чистым γ -излучателем и чистым β -излучателем. Иод-125, наиболее известный излучатель электронов Оже со временем полужизни около 60 дней, часто высвобождается иммуноконъюгатами in vivo (благодаря дегалогенизации). Наиболее часто применяемые α -излучатели для клинического применения астат-211 и висмут-212 обладают сравнительно короткими временами полужизни (7,2 ч и 1,0 ч соответственно) и превращаются в радиоактивные

изотопы, которые не могут удерживаться иммуноконъюгатом после первого α -излучения Wilbur, Antibiot. Immunocconj. Radiopharm. 4, 5-97 (1991)). Для диагностических приложений можно применять CD38BP, меченый индием-111 или технецием-99m. Оба эти изотопа испускают γ -лучи с энергией в интервале, подходящем для получения имиджей (100-250 кЭв). Энергии ниже этого уровня обычно не являются достаточно проникающими, чтобы достигать внешних устройств для получения изображений. Энергии более высоких уровней трудно коллимировать, и они дают изображения с низким разрешением. Короткоживущий ^{99}Tc обычно ограничивает свое применение иммуноконъюгатами с быстрым поглощением опухолями.

В одном варианте реализации предоставлены первый и второй конъюгаты CD38BP с первым и вторым радиоизотопами. В другом варианте реализации предоставлен один CD38BP, конъюгированный с двумя радиоизотопами. Преимуществом применения двух отдельных радиоизотопов, например одного для получения изображения и другого для терапии, является то, что это облегчает амбулаторное лечение. Низкое количество радиоактивности, применяемое для диагностики, не представляет радиационной угрозы, тогда как радиация, излучаемая терапевтическим изотопом, таким как чистый β -излучатель, обычно по большей части поглощается в окружении клеток мишени.

Радиоизотопы могут быть присоединены к CD38BP прямо или непрямо. Радиоизотопы ^{125}I , ^{131}I , ^{99}Tc , ^{186}Re и ^{188}Re могут быть, например, ковалентно связаны с белками (включая антитела) через функциональные группы аминокислот. Радиоактивный йод обычно связан через фенольную группу, находящуюся на тирозине. Есть множество методов для достижения этого: хроматин-Т (см., например, Greenwood et al., Biochem. J. 89, 114-123 (1963)) и йодоген (Salacinski et al., Anal. Biochem. 136-146 (1981)). Изотопы Tc и Re могут быть ковалентно связаны через сульфгидрильную группу цистеина (см., например, Griffiths et al., Cancer Res. 51, 4594-4602 (1991)). Однако такие композиции могут сравнительно лучше подходить для диагностических целей, поскольку организм часто может легко разбивать такие ковалентные связи, высвобождая радиоизотопы в циркуляторную систему.

CD38B можно также пометить ферментами, пригодными для детекции, например, пероксидазой хрена, β -галактозидазой, люциферазой, щелочной фосфатазой, глюкозооксидазой и т.п. CD38BP также можно пометить биотином и соответственно детектировать посредством непрямого измерения связывания авидина или стрептавидина. CD38BP также можно пометить predetermined полипептидными эпитопами, узнаваемыми вторичным репортером (например, последовательностью лейциновой заставки, участками связывания вторичных антител, доменами связывания металлов, эпитопами-тагами и т.д.). Дополнительные примеры ферментов кандидатов в конъюгаты включают малат-дегидрогеназу, нуклеазу стафилококка, дельта-V-стероид-изомеразу, алкогольдегидрогеназу дрожжей, α -глицерофосфат-дегидрогеназу, триозофосфат-изомеразу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу.

Дополнительные примеры звеньев, которые могут быть метками, по существу, включают, но не ограничиваются этим, спин-меченые молекулы и другие метки диагностического значения.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает перекрестно-сшитые производные CD38BP. Например, такое производное CD38BP можно получить посредством перекрестной сшивки двух или более антител, из которых по меньшей мере одно является специфичным/избирательным для CD38 (одного типа или разных типов, например, чтобы создать биспецифичные антитела). Подходящие перекрестно-сшивающие агенты включают такие, которые являются гетеробифункциональными, обладая двумя четко различающимися реактивными группами, разделенными подходящим спейсером (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие сшивающие агенты можно купить у Pierce Chemical Company, Rockford, III.

CD38BP также можно конъюгировать с химической группой любого подходящего типа, например پلیэтиленгликолем (ПЭГ), метильной или этильной группой или углеводородной группой. Эти и другие подходящие конъюгированные группы можно применять для улучшения биологических характеристик CD38BP, например улучшения сывороточного времени полужизни, растворимости и/или связывания тканей.

Производные CD38BP можно получать посредством химического присоединения радиоизотопа, белка или другого агента/звена/соединения к (а) N-концевому участку или C-концевому участку CD38BP или его субъединицы (например, тяжелой цепи анти-CD38BP антитела, легкой цепи анти-CD38BP антитела или его анти-CD38BP специфичного/избирательного фрагмента), подходящей группе заместителя или боковой цепи или (б) цепи сахара в CD38BP (например, см. Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Производные также можно получать посредством присоединения по внутренним остаткам или сахарам, когда требуется.

CD38BP также можно дериватизировать с помощью детектируемых агентов, например флуоресцентных соединений, включая флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафталинсульфонилхлорид, лантанидные фосфоры и т.п. Дополнительными примерами подходящих флуоресцентных меток являются ^{125}Eu метка, изотиоцианатная метка, фикоэритриновая метка, фикоциа-

ниновая метка, аллофикоцианиновая метка, о-фталдегидная метка, флуорескаминовая метка и т.д. Примеры хемилюминесцентных меток включают люминальные метки, изолюминальные метки, метки с ароматическими эфирами акридиния, имидозольные метки, метки с солями акридиния, метки с эфирами оксалата, люциферинозные метки, люциферазные метки, эквориновые метки и т.д.

В одном варианте реализации производное CD38BP включает конъюгированную нуклеиновую кислоту или связанную с нуклеиновой кислотой молекулу. В одном таком аспекте настоящего изобретения конъюгированная нуклеиновая кислота является цитотоксической рибонуклеазой. В одном варианте реализации настоящего изобретения конъюгированная нуклеиновая кислота является антисмысловой нуклеиновой кислотой (например, S100A10 нацеленная антисмысловая молекула, которая может быть независимым компонентом в составной композиции или комбинированном способе введения согласно настоящему изобретению, см., например, Zhang et al., J. Biol. Chem. 279(3), 2053-62 (2004)). В одном варианте реализации конъюгированная нуклеиновая кислота является ингибиторной РНК молекулой (например, siРНК молекулой). В одном варианте реализации, конъюгированная нуклеиновая кислота является иммуностимуляторной нуклеиновой кислотой (например, иммуностимуляторная молекула, содержащая ЦфГ-мотив молекула ДНК). В одном варианте реализации конъюгированная нуклеиновая кислота является экспрессирующей кассетой, кодирующей экспрессию гена супрессора опухоли, противораковую вакцину, противораковый цитокин или агент апоптоза. Такие производные могут также включать конъюгацию нуклеиновой кислоты, кодирующей экспрессию одного или более цитотоксических белков, таких как растительные или бактериальные токсины.

В одном варианте реализации CD38BP конъюгирован с функциональной молекулой нуклеиновой кислоты. Функциональные нуклеиновые кислоты включают антисмысловые молекулы, взаимодействующие молекулы нуклеиновой кислоты (например, siРНК молекулы), аптамеры, рибозимы, триплекс-образующие молекулы и внешние ведущие последовательности. Функциональные молекулы нуклеиновой кислоты могут действовать как эффекторы, ингибиторы, модуляторы и стимуляторы специфической активности, которой обладает молекула мишени, или функциональные молекулы нуклеиновой кислоты могут обладать *de novo* активностью, независимой от любой другой молекулы. Представительные примеры способов и техник, имеющих целью создавать и применять антисмысловые молекулы, можно найти в следующем неограничивающем списке патентов US: US 5135917, US 5294533, US 5627158, US 5641754, US 5691317, US 5780607, US 5786138, US 5849903, US 5856103, US 5919772, US 5955590, US 5990088, US 5994320, US 5998602, US 6005095, US 6007995, US 6013522, US 6017898, US 6018042, US 6025198, US 6033910, US 6040296, US 6046004, US 6046319 и US 6057437.

В одном варианте реализации CD38BP конъюгирован с аптамером. Аптамеры являются молекулами, которые взаимодействуют с молекулой мишени, например, специфическим способом. Обычно аптамеры являются небольшими нуклеиновыми кислотами в интервале от 15-50 оснований длиной, которые скручены в определенные вторичные и третичные структуры, например стебли-петли или Г-квартеты. Аптамеры могут связывать маленькие молекулы, такие как АТФ (US 5631146) и теофиллин (US 5580737), а также большие молекулы, как обратная транскриптаза (US 5786462) и тромбин (US 5543293). Представительные примеры того, как получать и применять аптамеры для связывания различных молекул мишени, можно найти в списке следующих неограничивающих патентов: US 5476766, US 5503978, US 5631146, US 5731424, US 5780228, US 5792613, US 5795721, US 5846713, US 5858660, US 5861254, US 5864026, US 5869641, US 5958691, US 6001988, US 6011020, US 6013443, US 6020130, US 6028186, US 6030776 и US 6051698.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который конъюгирован с рибозимом. Рибозимы являются молекулами нуклеиновой кислоты, которые способны катализировать химические реакции, внутримолекулярные либо межмолекулярные. Рибозимы являются таким образом каталитическими нуклеиновыми кислотами. Имеется большое число разных типов рибозимов, которые катализируют реакции нуклеазного или нуклеополимеразного типа, которые основаны на рибозимах, обнаруженных в природных системах, например в качестве (а) рибозимов с головкой молотка (описанных, например, в US 5334711, US 5436330, US 5616466, US 5633133, US 5646020, US 5652094, US 5712384, US 5770715, US 5856463, US 5861288, US 5891683, US 5891684, US 5985621, US 5989908, US 5998193, US 5998203, WO 9858058, WO 9858057 и WO 9718312), (б) шпилькообразных рибозимов (описанных, например, в US 5631115, US 5646031, US 5683902, US 5712384, US 5856188, US 5866701, US 5869339 и US 6022962) и (в) тетрагименовых рибозимов (описанных, например, в US 5595873 и US 5652107). Имеется также большое число рибозимов, которые не обнаруживаются в естественных системах, но которые созданы, чтобы катализировать специфические реакции *de novo* (примеры которых описаны, например, в US 5580967, US 5688670, US 5807718 и US 5910408). Рибозимы обычно расщепляют субстраты РНК и ДНК и чаще расщепляют РНК. Рибозимы обычно расщепляют нуклеиновые кислоты посредством узнавания и связывания субстрата мишени и последующего расщепления. Это узнавание часто основано, по существу, на канонических или неканонических взаимодействиях пар нуклеотидов. Это свойство делает рибозимы особенно хорошими кандидатами для специфического расщепления мишеней нуклеиновых кислот, потому что узнавание субстрата мишени основано на последовательности субстрата мишени. Представительные примеры того, как получать и применять рибозимы для ка-

тализа разнообразия различных реакций, можно найти в следующем неограничивающем списке патентов США: US 5646042, US 5693535, US 5731295, US 5811300, US 5837855, US 5869253, US 5877021, US 5877022, US 5972699, US 5972704, US 5989906 и US 6017756.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который конъюгирован с нуклеиновой кислотой, образующей триплекс. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут взаимодействовать либо с двухцепочечной, либо с одноцепочечной нуклеиновой кислотой. Когда молекулы триплекса взаимодействуют с участком мишени, образуется структура, называемая триплексом, в которой три цепочки ДНК образуют комплекс, зависимый как от формирования пар оснований по Утсону-Крику, так и по Хугстину. Молекулы триплекса могут связывать участки мишени с высоким сродством и специфичностью. Представительные примеры того, как получать и применять образующие триплекс молекулы для связывания ряда различных молекул-мишеней можно найти в следующем неограничивающем списке патентов США: US 5176996, US 5645985, US 5650316, US 5683874, US 5693773, US 5834185, US 5869246, US 5874566 и US 5962426.

В одном варианте реализации настоящее CD38BP конъюгирован с внешней ведущей последовательностью. Внешние ведущие последовательности (EGSs) являются молекулами, которые связывают молекулы нуклеиновой кислоты мишени с образованием комплекса, который узнается РНКазой Р, которая расщепляет молекулу мишени. EGS можно конструировать так, чтобы специфически нацеливаться на выбранную молекулу РНК. РНКазы Р помогают при процессинге транспортных РНК (тРНК) в клетке. Бактериальная РНКазы Р может быть задействована для расщепления фактически любой последовательности РНК с помощью EGS, которая образует комплекс мишень РНК:EGS, имитирующий природный субстрат тРНК (см., например, WO 92/03566 и Forster and Altaian, *Science* 238, 407-409 (1990) для обсуждения). Представительные примеры того, как получать и применять EGS молекулы для облегчения расщепления разнообразия различных молекул мишеней предоставлены в следующем неограничивающем списке US патентов: US 5168053, US 5624824, US 5683873, US 5728521, US 5869248 и US 5877162.

В одном варианте реализации CD38BP конъюгирован с взаимодействующей молекулой нуклеиновой кислоты, такой как siРНК или другая молекула РНК (например, ингибиторная двухцепочечная (дц) молекула РНК из приблизительно 20-25 нуклеотидов), которая направлена на то, чтобы препятствовать действию продукта экспрессии гена мишени, например продукта экспрессии гена, связанного с CD38-опосредованным заболеванием или состоянием. Способы продукции и применения взаимодействующих молекул нуклеиновой кислоты предоставлены, например, в Nishikura, *Cell* 107(4), 415-8 (2001), Fjose et al., *Biotechnol Annu Rev.* 7, 31-57 (2001), Hanon, *Nature* 418, 244-51 (2002), Brantl, *Biochim Biophys Acta* 1575(1-3), 15-25 (2002), Tuschl, *Chembiochem* 2(4), 239-45 (2001), Caplen, *Expert Opin Biol Ther.* 3(4), 575-86 (2003), Lu et al., *Curr Opin Mol Ther.* 5(3), 225-34 (2003), Shuey et al., *Drug Discov Today* 7(20), 1040-6 (2002), Shi, *Trends Genet.* 19(1), 9-12 (2003), Kovar et al., *Semin Cancer Biol.* 13(4), 275-81 (2003), Lavrey et al., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6(4), 561-9 (2003), Clewey, *Commun Dis Public Health.* 6(2), 162-3 (2003), Duxbury et al., *J Surg Res.* 117(2), 339-44 (2004), Caplen et al., *Ann N.Y. Acad Sci.* 1002, 56-62 (2003), WO 01/75164, US 6506559, US 20040086884, US 20040077574, US 20040063654, US 20040033602, US 20030167490, US 20030157030, US 20030114409, US 20030108923, US 20040014113 и US 20020132788.

В одном варианте реализации CD38BP конъюгирован с доменом или молекулой пептида, нацеленным на опухоль. В одном варианте реализации CD38BP конъюгирован с последовательностью фактора VII, нацеленного на опухоль.

Любой известный в данной области способ для конъюгации CD38BP с конъюгированной молекулой можно применять, как, например, описанные выше, включая способы, описанные в Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962), David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981) и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). Связывание/конъюгацию можно проводить любым подходящим способом. Например, ковалентная связь может принимать форму дисульфидной связи (если нужно и возможно, можно создать CD38BP, содержащий дополнительный кодон цистеина, который предпочтительно не мешает CD38-связывающей активности молекулы. Молекула токсина, дериватизированная сульфгидрильной группой, реагирующей с цистеином CD38BP, может образовать иммуноконъюгат с CD38BP пептидом. Альтернативно, сульфгидрильную группу можно ввести непосредственно в CD38BP, применяя полипептидные техники в твердой фазе. Например, введение сульфгидрильных групп в пептиды описано в Hiskey, *Peptides* 3, 137 (1981). Введение сульфгидрильных групп в белки описано в Maasen et al., *Eur. J. Biochem.* 134, 32 (1983). Как только нужная сульфгидрильная группа на месте, цитотоксин и CD38BP можно очистить, восстановить обе сульфгидрильные группы, смешать цитотоксин и лиганд (например, в соотношении приблизительно от 1:5 до 1:20) и оставить инкубироваться до завершения образования дисульфидной связи (по существу, приблизительно 20-30 мин) при комнатной температуре. Смесь можно далее диализовать против фосфатного буфера с физиологическим раствором или хроматографировать на таком носителе, как Сефадекс для удаления непрореагировавших молекул лиганда и токсина.

Многочисленные типы цитотоксических соединений можно присоединять к белкам с помощью применения реактивной группы цитотоксического соединения или с помощью применения сшивающего

агента. Распространенной реактивной группой, которая образует стабильную ковалентную связь *in vivo* с амином, является изотиоцианат (Means et al., *Chemical modifications of proteins* (Holden-Day, San Francisco 1971), pp. 105-110). Эта группа предпочтительно реагирует с ϵ -аминогруппой лизина. Малеймид является широко применяемой реактивной группой для образования стабильной *in vivo* ковалентной связи с сульфгидрильной группой цистеина (Ji., *Methods Enzymol* 91., 580-609 (1983)). Моноклональные антитела обычно неспособны образовывать ковалентные связи с ионами радиоактивных металлов, но они могут быть присоединены к антителу непрямо с помощью применения хелатирующих агентов, которые ковалентно связаны с антителами. Хелатирующие агенты могут быть присоединены через амины (Meares et al., *Anal. Biochem.* 142, 68-78 (1984)) и сульфгидрильные группы (Koyama, *Chem. Abstr.* 120, 217262t (1994)) аминокислотных остатков и также через углеводородные группы (Rodwell et al., *PNAS USA* 83, 2632-2636 (1986), Quadri et al., *Nucl. Med. Biol.* 20, 559-570 (1993)). Поскольку такие хелатирующие агенты содержат два типа функциональных групп, одну для связывания ионов металла и другую для присоединения хелатора к антителу, они обычно называются бифункциональными хелатирующими агентами (Sundberg et al., *Nature* 250, 587-588 (1974)).

Сшивающие агенты с двумя реактивными функциональными группами подразделяются на гомо- или гетеробифункциональные. Примерами гомобифункциональных сшивающих агентов являются бисмалеимидогексан (BMH), который реагирует с сульфгидрильными группами (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 266, 18237-18243 (1991)) и этиленгликольбис[сукцинимидилсукциат], (EGS) который реагирует с аминогруппами (Browning et al., *J. Immunol.* 143, 1859-1867 (1989)). Примером гетеробифункционального сшивающего агента являются *m*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимидный эфир (MBS) (Myers et al., *J. Immunol. Meth.* 1, 129-142 (1989)). Эти способы просты и часто применяются.

Терапевтический или диагностический агент можно также или альтернативно присоединять в участке связки восстановленного компонента антитела через образование дисульфидной связи. В качестве альтернативы такие пептиды можно присоединять к компоненту антитела с применением гетеробифункционального сшивающего агента, например *N*-сукцинил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP), Yu et al., *Int. J. Cancer* 56, 244 (1994). Основные способы такого присоединения хорошо известны в данной области. См., например, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking* (CRC Press 1991), Upeslaci et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods", In *Monoclonal Antibodies: Principles And Applications*, Birch et al., (eds.) (Wiley-Liss, Inc. 1995), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application*, Ritter et al., (eds.) (Cambridge University Press 1995).

В некоторых вариантах реализации метки и другие конъюгированные заместители присоединены к аминокислотной последовательности CD38BP при помощи разделительных рук разной длины для уменьшения потенциального стерического затруднения.

Немеченые CD38BP можно применять в комбинации с другими мечеными антителами (вторичными антителами), которые реактивны с CD38BP, например антитела, специфичные для константных участков иммуноглобулина человека, которые связываются с анти-CD38 mAbs. Альтернативно, CD38BP можно пометить прямо. Широкое разнообразие меток можно применять для прямого или непрямого мечения CD38BP, например мечения радиоизотопами, флуорофорами, ферментами, субстратами ферментов, кофакторами ферментов, ингибиторами ферментов, лигандами (особенно, гаптенами) и т.д.

Вставки аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбоксиконцевые присоединения длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также внутренние вставки в последовательность из одной или многих аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с *N*-концевым остатком метионина или антитело, присоединенное к эпитопной метке. Другие варианты молекул антител со вставкой включают присоединения к *N*- или *C*-концу антитела фермента или полипептида или ПЭГ, что увеличивает сывороточное время полужизни антитела. Такие составные с анти-CD38 антителом белки, включающие CD38BP последовательности, являются другим свойством настоящего изобретения.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает молекулы, включающие CD38BP, например анти-CD38 антитело человека согласно настоящему изобретению, конъюгированное с терапевтическим звеном, таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарство, иммуносуппрессант или радиоактивный изотоп. Такие конъюгаты называются в настоящей заявке "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, включающие один или более цитотоксины, называются "иммунотоксинами".

Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, приносящий ущерб (т.е. убивающий) клеткам. Для описания таких классов лекарств, известных в данной области, и механизмов их действия см. Goodman et al., Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Дополнительные способы, относящиеся к получению антител иммунотоксина, предоставлены, например, в Vitetta, *Immunol. Today* 14, 252 (1993) и US 5194594.

Подходящие терапевтические агенты для образования иммуноконъюгатов согласно настоящему изобретению включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксид антрациндиион, митоксантрон, актиномицин D, 1-дегидрокситестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетра-

каин, лидокаин, пропранолол и пурамицин, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанидин, цитарабин, флюдарабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиоепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSMU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, например карбоплатин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубицин (ранее дауномицин), доксорубицин, идарубицин, митрамицин, калихеамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (АМС)), дифтерийный токсин и родственные молекулы (например, активные фрагменты А цепи дифтерийного токсина и гибридные молекулы), токсин рицин (например рицин А или дегликозилированный токсин цепи А рицина), токсин холеры, шигоподобный токсин, (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), LT токсин, СЗ токсин, шига-токсин, токсин пертуссина, токсин столбняка, ингибитор протеаз Боумана-Бирка из соевых бобов, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модексин, геланин, цепь абрина А, модексина А цепь, α -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca Americana* (РАР, РРІ и РАР-С) *Momordica charantia* ингибитор, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин. Терапевтические агенты, которые можно назначать в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению, как описано в другом месте в настоящей заявке, также могут быть кандидатами в терапевтические части для конъюгации с CD38BP настоящего изобретения. Например, звено лекарства может быть белком или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активные токсины или их активный фрагмент, например, абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин; белок, например фактор некроза опухолей или интерферон- γ , или модификаторы биологического ответа, например лимфокины, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), фактор стимуляции колоний макрофагов гранулоцитов (GM-CSF), фактор стимуляции колоний гранулоцитов (G-CSF) или другие факторы роста и белки, индуцирующие апоптоз, выделенные из митохондрий.

В одном варианте реализации цитотоксический агент является калихеамицином, ^{90}Y , ^{125}I и ^{131}I .

Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с CD38BP настоящего изобретения, включают калихеамицины и дуокармицины. Как отмечалось выше, лекарственное звено не следует толковать как ограниченное классическими химическими терапевтическими агентами. Например, лекарственное звено может быть белком или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, агент активный на поверхности клеток, например ферменты фосфолипазы, например фосфолипазу С.

Лизирующую часть токсина можно легко присоединить к Fab фрагменту антитела или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению. Другие подходящие для конъюгации молекулы включают рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин А, антивирусный белок лаконоса, дифтерийный токсин и эндотоксин *Pseudomonas*. См., например, Pastan et al., Cell. 47, 641 (1986) and Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Дополнительные токсины, подходящие для применения в настоящем изобретении, известны специалистам в данной области техники (см., например, US 6077499).

Конъюгаты CD38BP, такие как антитела и такие как цитотоксические звенья, можно получать с применением бифункциональных агентов связывания белков. Примеры таких реагентов включают SPDP, IT, бифункциональные производные иммуноэфиров, например диметил адипимидат HCl, активные эфиры, например дисукцинимидинил суберат, альдегиды, например глutarальдегид, бис-азидосоединения, например бис(р-азидобензоил)гександиамин, производные бис-диазония, например бис-(р-диазонийбензоил)этилендиамин, диизоцианаты, например толилен-2,6-диизоцианат, и бис-активные соединения фтора, например 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, и противомитотические агенты (например, винкристин, винбластин, доцетаксель, паклитаксель и винорелбин).

Способы конъюгации таких терапевтических звеньев с CD38BP, например антител, хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985), Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987), Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), pp. 475-506 (1985), "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62, 119-58 (1982).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который конъюгирован со смешанным токсином. Молекулой смешанного токсина является молекула, произведенная из двух различных (обычно полипептидных) токсинов. По существу, пептидные токсины включают один или более доменов, ответственных за генерализованное связывание эукариотических клеток, по меньшей мере один ферментативно активный домен и по меньшей мере один транслокационный домен. Связы-

вающие и транслоцирующие домены необходимы для узнавания клеток и входа токсина соответственно. Встречающие в природе белки, как известно, включающие домен транслокации, включают дифтерийный токсин, эндотоксин A *Pseudomonas* и возможно другие пептидные токсины. Домены транслокации дифтерийного токсина и эндотоксина A *Pseudomonas* хорошо охарактеризованы (см., например, Hoch et al., PNAS USA 82, 1692 (1985), Colombatti et al., J. Biol. Chem. 261, 3030 (1986) and Deleers et al., FEBS Lett. 160, 82 (1983)) и существование и расположение такого домена в других молекулах можно определить способами, например, примененными в Hwang et al., Cell. 48, 129 (1987) and Gray et al., PNAS USA 81, 2645 (1984). Ввиду этих способов применимая молекула смешанного гибридного токсина может быть образована, например, посредством соединения ферментативно-активной А субъединицы шигаподобного токсина из *E. Coli* (Calderwood et al., PNAS USA 84, 4364 (1987)) с транслокационным доменом (аминокислотными остатками от 202 до 460) дифтерийного токсина и с молекулой, направленной на определенный тип клеток, как описано в US 5906820. Направляющая часть такого трехчастного гибрида может обусловить специфическое присоединение молекулы к клеткам мишени и транслокационная часть дифтерийного токсина может действовать так, чтобы ввести ферментативно активную субъединицу А шигаподобного токсина в клетку мишени. Ферментативно активная часть шигаподобного токсина подобно дифтерийному токсину действует на механизм синтеза белка в клетке, предотвращая синтез белка, таким образом убивая клетку мишени.

Иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению могут также включать радиоизотопы, например йод-131, иттрий-90 или индий-111, для генерации цитотоксических радиоактивных лекарств для лечения связанных с CD38BP нарушений, например множественной миеломы.

В одном варианте реализации CD38BP, такие как антитела человека согласно настоящему изобретению, присоединены к линкеру-хелатору, например труксетану, который позволяет конъюгировать антитело с радиоизотопом.

Дополнительно применимые конъюгируемые заместители включают противораковые ретиноиды, конъюгаты таксана (см., например, Instance Jaime et al., Anticancer Res. 21(2A), 1119-28 (2001), конъюгаты цисплатина, тапсигаргиновые конъюгаты, конъюгаты линоленовой кислоты, конъюгаты калихеамицина (см., например, Damle et al., Curr Opin Pharmacol. 3(4), 386-90 (2003), конъюгаты доксорубина, конъюгаты гелданамицина и т.п. также могут применяться для облегчения лечения рака (см., по существу, Trail et al., Cancer Immunol. Immunother. 52(5), 328-37 (2003)).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает вторичные и антиидиотипические антитела, выработанные против анти-CD38 антител согласно настоящему изобретению. Вторичное антитело относится к антителу, специфическому к и обычно выработанному против анти-CD38 антитела. Антиидиотипическое антитело (Id) является антителом, которое узнает уникальные детерминанты, по существу, связанные с антиген-связывающим участком антитела. Id-антитело можно получать посредством иммунизации животного того же вида и генетического типа, как источник анти-CD38 mAb с помощью mAb, к которому анти-Id получают. Иммунизированное животное, обычно, может распознавать и отвечать на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела посредством продукции антитела к этим идиотипическим детерминантам (анти-Id антитело). Такие антитела описаны, например, в US 4699880. Такие антитела являются еще одним свойством настоящего изобретения.

Анти-Id антитело можно также применять в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа у еще одного животного, продуцирующего так называемое анти-анти-Id антитело. Анти-анти-Id антитело может быть идентично по эпитопу исходному mAb, который индуцировал анти-Id антитело. Так, применяя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, возможно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела с идентичной специфичностью. Анти-Id антитела можно варьировать (таким способом производя варианты анти-Id антитела) и/или дериватизировать любым подходящим способом, например, как описано в настоящей заявке в другом месте относительно анти-CD38 антител согласно настоящему изобретению. Например, анти-Id mAb можно соединять с переносчиком, например гемоцианином моллюска (keyhole limpet) (KLH), и применять для иммунизации BALB/c мышей. Сыворотка таких мышей обычно содержит анти-анти-Id антитела, которые обладают свойствами связывания сходными, если не идентичными таковым, исходного/родительского CD38 антитела.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает нуклеиновую кислоту, кодирующую CD38BP. Нуклеиновая кислота, кодирующая CD38BP, может обладать любыми подходящими характеристиками и включать любые подходящие свойства или их комбинацию. Так, например, нуклеиновая кислота, кодирующая CD38BP, может быть в форме ДНК, РНК или их гибрида и может включать не встречающиеся в природе основания, модифицированный скелет (например, фосфотиоатный скелет, который способствует стабильности нуклеиновых кислот) или оба. Нуклеиновая кислота преимущественно включает свойства, способствующие желаемой экспрессии в клетке хозяина мишени, репликации и/или отбору. Примеры таких свойств включают компонент начала репликации, компонент отбора гена, компонент промотора, компонент элемента усилителя, компонент последовательности полиаденилирования, компонент терминации и т.п.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает вектор, включающий кодирующую CD38BP нуклеиновую кислоту. Вектор относится к средству доставки, которое способствует

экспрессии кодирующей CD38BP нуклеиновой кислоты, продукции CD38BP пептида, трансфекции/трансформации клеток мишени, репликации кодирующей CD38BP нуклеиновой кислоты, способствует стабильности нуклеиновой кислоты, способствует детекции нуклеиновой кислоты и/или трансформированных/трансфицированных клеток или другим способом придает выгодную биологическую функцию кодирующей CD38BP нуклеиновой кислоте. Вектор в контексте настоящего изобретения может быть любым подходящим вектором, включая векторы, состоящие из хромосомной, нехромосомной и синтетической нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, включающая необходимый набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, плазмиды дрожжей, векторы, произведенные из комбинации плазмиды и фаговой ДНК, и вирусную нуклеиновую кислоту (РНК или ДНК) векторы. В одном варианте реализации кодирующая CD38BP нуклеиновая кислота включает вектор из голой ДНК или РНК, включающий, например, линейный элемент экспрессии (как описано, например, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* T7, 355-59 (1997)), вектор из сжатой нуклеиновой кислоты (как описано, например, в US 6077 835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, "мош-ку" вектор из нуклеиновой кислоты минимального размера (как описано, например, в Schakowski et al., *Mol. Ther* 3, 793-800 (2001)), или осажденную конструкцию вектора из нуклеиновой кислоты, например, CaPO₄-осажденная конструкция (как описано, например, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие векторы из нуклеиновой кислоты и их применение хорошо известны в данной области (см., например, US 5589466 и US 5973972).

В одном варианте реализации вектор подходит для экспрессии CD38BP в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают, например, векторы, которые направляют высокий уровень экспрессии составных белков, которые легко очищать (например, мультифункциональные клонирующие и экспрессирующие векторы *E. coli* например BlueScript (Stratagene), pIN векторы (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509 (1989), pET векторы (Novagen, Madison WI) и т.п.).

Экспрессирующий вектор может также или альтернативно быть вектором, подходящим для экспрессии в дрожжевой системе. Любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе, можно применять. Подходящие векторы для применения, например, в *Saccharomyces cerevisiae* включают, например, векторы, включающие конститутивные или индуцибельные промоторы, например α -фактор, алкоголь-оксидаза и PGH (обзор в F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), and Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Нуклеиновая кислота и/или вектор может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/расположения, которая может направлять полипептид, например рождающуюся полипептидную цепь в нужный компартмент клетки, мембрану или органеллу или который направляет секрецию полипептида в периплазматическое пространство или в культуральную среду клетки. Такие последовательности известны в данной области и включают секреторный лидер или сигнальные пептиды, последовательности, направляющие в органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ЭР, последовательности переноса в хлоропласты), мембранные локализирующие/якорные последовательности (например, последовательности остановки переноса, последовательности GPI якоря) и т.п.

CD38BP-кодирующие нуклеиновые кислоты могут включать или быть связанными с любым подходящим промотором, усилителем и другими облегчающими экспрессию элементами. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, CMV IE промотор/усилитель человека, а также RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV LTR промоторы), эффективные поли(A) терминирующие последовательности, начало репликации плазмид в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве маркера селективности и/или подходящий участок клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты также могут включать индуцибельный промотор в противоположность конститутивному промотору, такому как CMV IE (специалист в данной области поймет, что эти термины в действительности описывают степени экспрессии гена в определенных условиях).

В одном варианте реализации, нуклеиновая кислота может находиться и/или доставляться в клетку хозяина или животное-хозяин с помощью вирусного вектора. Любой подходящий вирусный вектор можно применять для этого, и несколько таких векторов известны в данной области. Вирусный вектор может включать любое число вирусных полинуклеотидов отдельно или в сочетании с одним или более вирусным белком, облегчающим доставку, репликацию и/или экспрессию нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в нужной клетке-хозяин. Вирусный вектор может быть полинуклеотидом, включающим весь или часть вирусного генома, вирусным конъюгатом белок/нуклеиновая кислота, вирусоподобной частицей (VLP), вектором, сходным с описанными в US 5849586 и WO 97/04748, или интактной вирусной частицей, включающей вирусную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Вирусный вектор вирусной частицы может включать вирусную частицу дикого типа или модифицированную вирусную частицу. Вирусный вектор может быть вектором, который требует присутствия другого вектора или вируса дикого типа для репликации и/или экспрессии (например, он может быть зависимым от помощника вирусом), например ампликона аденовирусного вектора.

Обычно такие вирусные векторы состоят, по существу, из вирусной частицы дикого типа или вирусной частицы, модифицированной по своему белковому или нуклеиновокислотному содержанию для увеличения трансгенной способности или помощи при трансфекции и/или экспрессии нуклеиновой кислоты (примеры таких векторов включают ампликоны вируса герпеса/AAV). Обычно вирусный вектор похож на и/или произведен из вируса, который в норме инфицирует животных. Частицы подходящего вирусного вектора в этом отношении включают, например, частицы аденовирусного вектора (включая любой вирус или произведенный из вируса семейства аденовирусов), аденосвязанную вирусную частицу (AAV вирусные частицы) или другие парвовирусы и парновирусные векторные частицы, папилломавирусные векторные частицы, флавивирусные векторы, альфавирусные векторы, векторы вируса герпеса, векторы вируса оспы, ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы. Примеры таких вирусов и вирусных векторов находятся, например, в Fields et al., eds., *Virology* Raven Press, Ltd., New York (3rd ed., 1996 and 4th ed., 2001), *Encyclopedia of Virology*, R.G. Webster et al., eds., Academic Press (2nd ed., 1999), *Fundamental Virology*, Fields et al., eds., Lippincott-Raven (3rd ed., 1995), Levine, "Viruses," *Scientific American Library* No. 37 (1992), *Medical Virology*, D.O. White et al., eds., Acad. Press (2nd ed. 1994), and *Introduction to Modern Virology*, Dimock, N.J. et al., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. (1994).

Вирусные векторы, которые можно применять вместе с полинуклеотидами согласно настоящему изобретению и способы, описанные в настоящей заявке, включают аденовирусный и аденосвязанные векторы, как, например, в Carter, *Curr Opin Biotech* 3, 533-539 (1992) and Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129 (1992). Дополнительные типы и аспекты AAV векторов описаны, например, в Carter, *Contrib. Microbiol.* 4, 85-86 (2000), Smith-Arica, *Curr. Cardiol. Rep.* 3(1), 41-49 (2001), Taj, J. *Biomed. Sci.* 7(4), 279-91 (2000), Vigna et al., *J. Gene Med.* 2(5), 308-16 (2000), Klimatcheva et al., *Front. Biosci.* 4, D481-96 (1999), Lever et al., *Biochem. Soc. Trans.* 27(6), 841-47 (1999), Snyder, J. *Gene Med.* 1(3), 166-75 (1999), Gerich et al., *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 5(2), 118-23 (1998) и Daring, *Adv. Drug Deliv. Review* 27(1), 83-94 (1997) и US 4797368, US 5139941, US 5173414, US 5614404, US 5658785, US 5858775 и US 5994136). Аденосвязанные вирусные векторы можно конструировать и/или очищать с применением способов, описанных, например, в US 4797368 и Laughlin et al., *Gene* 23, 65-73 (1983).

Другой тип вирусного вектора, который можно применять с полинуклеотидами и способами согласно настоящему изобретению, является папилломавирусным вектором.

Подходящие папилломавирусные векторы известны в данной области и описаны, например, в Hewson, *Mol. Med. Today* 5(1), 8 (1999), Stephens, *Biochem J.* 248(1), 1-11 (1987) и US 5719054. Примеры папилломавирусных векторов предоставлены, например, в WO 99/21979. Альфавирусные векторы могут быть средствами доставки генов в другом контексте. Альфавирусные векторы известны в данной области и описаны, например, в Carter, *Curr Opin Biotech* 3, 533-539 (1992), Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol.* 158, 97-129 (1992), Schlesinger, *Expert Opin Biol Ther.* 1(2), 177-91 (2001), Polo et al., *Dev Biol (Basel)*. 104, 181-5 (2000), Wahlfors et al., *Gene Ther.* 7(6), 472-80 (2000), Colombage et al., *Virology.* 250(1), 151-63 (1998) and WO 01/81609, WO 00/39318, WO 01/81553, WO 95/07994 и WO 92/10578.

Другой группой вирусных векторов являются векторы вируса герпеса. Примеры векторов на основе вируса герпеса описаны, например, в Lachmann et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1(5), 622-32 (1999), Fraefel et al., *Adv. Virus Res.* 55, 425-51 (2000), Huard et al., *Neuromuscul Z(5)*, 299-313 (1997), Glorioso et al., *Annu Rev. Microbiol.* 49, 675-710 (1995), Latchman, *Mol. Biotechnol.* 2(2), 179-95 (1994), and Frenkel et al., *Gene Ther.* i(Suppl 1), S40-6 (1994), а также в US 6261552 и US 5599691.

Ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы, также могут быть полезными средствами доставки генов в отдельных случаях. Имеется множество ретровирусных векторов, известных в данной области. Примеры ретровирусных векторов описаны, например, в Miller, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 1-24 (1992), Salmons and Gunzburg, *Human Gene Therapy* 4, 129-141 (1993), Miller et al., *Methods in Enzymology* 217, 581-599 (1994), Weber et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(5), 439-53 (2001), Hu et al., *Pharmacol. Rev.* 52(4), 493-511 (2000), Kim et al., *Adv. Virus Res.* 55, 545-63 (2000), Palu et al., *Rev. Med. Virol.* 10(3), 185-202 (2000) and Takeuchi et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 465, 23-35 (2000), а также в US 6326195, US 5888502, US 5580766 и US 5672510.

Аденовирусные векторы также могут быть подходящими векторами для переноса генов. Аденовирусные векторы хорошо известны в данной области и описаны, например, в Graham et al., *Mol. Biotechnol.* 33(3), 207-220 (1995), Stephenson, *Clin. Diagn. Virol.* 10(2-3), 187-94 (1998), Jacobs, *Clin. Sci (Lond)*. 85(2), 117-22 (1993), US 5922576, US 5965358 and US 6168941 и WO 98/22588, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441 и WO 00/32754. Аденовирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса и Sindbis вирусные векторы, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Jolly *Cancer Gene Therapy* 1, 51-64 (1994), Latchman *Molec Biotechnol* 2, 179-195 (1994) и Johanning et al., *Nucl Acids Res* 23, 1495-1501 (1995).

Другие подходящие вирусные векторы включают векторы вируса оспы. Примеры таких векторов описаны, например, в Berencsi et al., *J. Infect Dis.* 183(8), 1171-9 (2001), Rosenwirth et al., *Vaccine* 19(13-14), 1661-70 (2001), Kittlesen et al., *J. Immunol.* 164(8), 4204-11 (2000), Brown et al., *Gene Ther.* 7(19), 1680-9 (2000), Kanasa-thasan et al., *Vaccine* 19(4-5), 483-91 (2000), Sten, *Drugs* 60(2), 249-71 (2000). Векторы вируса вакцинии могут быть векторами вируса оспы. Примеры таких векторов и их применение предостав-

лены, например, в Venugopal et al., Res. Vet. Sci 57(2), 188-193 (1994), Moss. Dev. Biol. Stand 82, 55-63 (1994), Weisz et al., Mol. Cell. Biol. 43, 137-159 (1994), Mahr and Payne, Immunobiology 184(2-3), 126-146 (1992), Hruby, Clin Microbiol Rev 3(2), 153-170 (1990) и WO 92/07944, WO 98/13500 и WO 89/08716.

Другие свойства настоящего изобретения включают рекомбинантные клетки, такие как дрожжевые, бактериальные или клетки млекопитающих (например, бессмертные клетки млекопитающих), включающие такую нуклеиновую кислоту, вектор или комбинацию с одним или с ними обоими. Например, в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает клетку, включающую нуклеиновую кислоту, устойчиво интегрированную в клеточный геном, которая включает последовательность, кодирующую экспрессию CD38BP согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает клетку, включающую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, например плазмиду, космиду, фagemиду или линейный элемент экспрессии, которые включают последовательность, кодирующую экспрессию CD38BP.

Настоящее изобретение также предоставляет иммуногенные пептиды, включающие любую из вышеописанных частей антигенных детерминант CD38-специфичных для CD38BP согласно настоящему изобретению, например части антигенных детерминант CD38, специфичные для -003 и -005 и -023. Такие иммуногены можно применять для вызывания прямого иммунного ответа по способу, включающему режим активной иммунотерапии. Настоящее изобретение далее предоставляет составной белок, включающий такой CD38 иммуноген и последовательность партнера, которая улучшает время полужизни составного белка (например, посредством включения последовательности домена иммуноглобулина); упрощает детекцию и/или очистку составного белка (посредством включения, например, последовательности флуоресцирующего белка, последовательности репортерного фермента, эпитопной метки, шестигистициновой последовательности и т.п.); содействует нацеливанию составного белка (например, посредством включения лиганда или части лиганда, специфичного для рецептора клетки мишени); способствует индукции отчетливого иммунного ответа (например, соответствует раковому антигену или его иммуногенному фрагменту), является цитотоксическим агентом или обеспечивает любую их комбинацию (например, белок теплового шока в качестве партнера может увеличивать иммунный ответ, образованный против несходного, гетерологичного антигена части составного белка, в то же время увеличивая *in vivo* время жизни составного белка). Составные белки могут также включать один или более участков расщепления, особенно между доменами.

Варианты таких пептидов и производные таких иммуногенных пептидов или варианты иммуногенных пептидов являются дополнительными свойствами настоящего изобретения (например, такие производные CD38 иммуногенные пептиды можно модифицировать с помощью химического сопряжения, генетического связывания, нековалентного связывания и т.п. с другими молекулярными модулями, например антителами, токсинами, радиоизотопами, цитотоксическими агентами или цитостатическими агентами). Пептидные мимитопы, включая последовательности CD38 эпитопа, можно также, например, применять в качестве кандидатов на роль вакцины. Такие пептиды можно также применять для очистки анти-CD38 антител. Дополнительно к последовательностям эпитопов В-клеток, описанным в настоящей заявке, такие пептиды можно конструировать или выбирать также или альтернативно так, что они включают один или более анти-CD38 эпитоп Т-клетки. Такие эпитопы можно идентифицировать с помощью любой подходящей техники, известной в данной области (например, с помощью приложений программ предсказания эпитопа Т-клеток).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает нуклеиновую кислоту, кодирующую такой иммуногенный пептид. Такую нуклеиновую кислоту можно доставлять хозяину с помощью любого подходящего вектора, например направленного вектора с нарушенной репликацией (например, направленный нуклеиновокислотный вектор или направленный аденовирусный вектор с нарушенной репликацией). Настоящее изобретение также предоставляет композиции из одного или более таких иммуногенных пептидов и/или кодирующих иммуногенный пептид нуклеиновых кислот.

CD38BP согласно настоящему изобретению включают "нейтрализующие" CD38BP, например, нейтрализующие антитела. Термин "нейтрализующие CD38BP" и "нейтрализующие антитела" относится к CD38BP или антителу, которое способно значительно ингибировать или уничтожать биологическую активность CD38-связанного пептида. Обычно нейтрализующее CD38BP, например нейтрализующее анти-CD38 антитело, могут ингибировать прямо или непрямо функцию CD38, например ферментативную активность, передачу сигнала, индукцию экспрессии цитокинов, индукцию пролиферации или дифференциации или индукцию лизиса в степени, которая приблизительно равна или больше ингибирования таких клеток благодаря применению приблизительно равного количества -003 или -005 или -024.

CD38BP согласно настоящему изобретению может обладать любым подходящим средством и/или авидностью к одному или более эпитопу, содержащемуся, по меньшей мере, отчасти в CD38. Средство относится к силе связывания CD38BP с таким эпитопом. Обычно средство измеряют с помощью константы диссоциации K_d , определяемой как $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, где $[Ab-Ag]$ - это молярная концентрация комплекса антитело-антиген (или комплекса CD38BP-антиген), $[Ab]$ - молярная концентрация несвязанного антитела (или CD38BP) и $[Ag]$ - молярная концентрация несвязанного антигена. Константа средства K_a определяется как $1/K_d$. Подходящие способы определения специфичности и средства посредством

конкурентного ингибирования можно найти, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993) и Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983).

CD38BP и, в частности, анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению могут обладать сродством по меньшей мере к одному эпитопу, по меньшей мере, частично включенному в CD38 в интервале от приблизительно 10^{-4} до приблизительно 10^{-10} M^{-1} . Термин "иммунореагирует" обычно относится в настоящей заявке к связыванию CD38BP с CD38 эпитопом с константой диссоциации K_d ниже приблизительно 10^{-4} M^{-1} .

CD38B может обладать сродством, которое, по меньшей мере, так же велико для CD38, как у антител -003, -005 и -024, и в некоторых вариантах реализации обладает сродством, которое, по меньшей мере, приблизительно так же велико, как у антител -003, -005 и -024. Сродство можно определять с помощью любого из способов, описанных в настоящей заявке, или их известных в данной области эквивалентов. Пример способа, который можно применять для определения сродства, приведен в анализе по Скэтчарду в Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107, 220 (1980). Сродство связывания можно также определять с помощью равновесных способов (например, анализа с помощью связанного с ферментом иммуноабсорбента (ELISA), или радиоиммунологического анализа (RIA), или кинетического анализа (например, BIACORE™ анализа).

Обычно константа диссоциации для CD38BP, например анти-CD38 антител, согласно настоящему изобретению составляет меньше приблизительно 100 нМ, меньше приблизительно 50 нМ, меньше приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 0,5 нМ или менее, приблизительно 0,1 нМ или менее, приблизительно 0,01 нМ или менее или даже приблизительно 0,001 нМ или менее.

CD38BP, например анти-CD38 антитела, согласно настоящему изобретению могут проявлять сходные функциональные характеристики, как -003 и -005 и -024, как можно определить с помощью анализа зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) и опосредованной комплементом цитотоксичности (CDC) (см., например, US 5500362).

В одном варианте реализации пептид согласно настоящему изобретению не действует как агонист CD38 или антагонист CD38. Агонист CD38 является молекулой, которая активирует одну или более функций, приписываемую CD38. Такие функции могут включать опосредование рецептора в адгезии и процессах передачи сигнала и (экто) ферментативную активность. Далее в качестве эктофермента CD38 применяет HA^+ в качестве субстрата для образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и АДФР, а также никотинамида и аденидинуклеотидфосфата никотиновой кислоты (НКАДФ). Показано, что цАДФР действует как вторичный мессенджер для мобилизации Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулюма. Дополнительно к передаче сигнала через Ca^{2+} передача сигнала с помощью CD38 происходит через взаимодействие (cross-talk) с антиген-рецепторными комплексами на Т- и В-клетках или другими типами рецепторных комплексов, например МНС молекулами, и таким образом участвует в нескольких клеточных ответах, а также в переключении и секреции IgG1.

В одном варианте реализации пептид согласно настоящему изобретению не индуцирует значительной пролиферации PMBC. В одном варианте реализации пептид согласно настоящему изобретению не индуцирует высвобождение значительных уровней IL-6. В одном варианте реализации пептид согласно настоящему изобретению не индуцирует высвобождение детектируемых уровней IFN- γ . Такие анализы можно проводить, как описано в Ausiello et al., *Tissue antigens* 56, 538-547 (2000).

Анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению, а также другие CD38BP согласно настоящему изобретению можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии в любом подходящем типе клеток или животных.

Рекомбинантные CD38BP, например рекомбинантные антитела, например рекомбинантные антитела человека, включают CD38BP, например антитела, например, антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, например, CD38BP, например, антитела, например антитела человека, экспрессируемые с применением рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку хозяина.

Рекомбинантные антитела, например рекомбинантные антитела человека, также включают антитела, выделенные из рекомбинантных комбинаторных библиотек антител человека, антитела, выделенные из животных, например трансгенных животных, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым способом, который исключает сплайсинг последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноглобулин человека, с другими последовательностями нуклеиновых кислот экзогенных для нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноглобулин человека, и генов, кодирующих иммуноглобулин человека. Рекомбинантные антитела человека, обычно, имеют вариабельные и константные участки, произведенные из последовательностей иммуноглобулина зародышевых линий человека. В определенных вариантах реализации, однако, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или в случае применения животного, трансгенного для последовательностей

иммуноглобулина человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и таким образом аминокислотные последовательности V_H и V_L участков рекомбинантных антител могут быть последовательностями, которые будучи произведенными и родственными V_H и V_L последовательностям зародышевых линий человека, могут не существовать в природе в репертуарах антител зародышевых линий человека *in vivo*. Оба типа антител человека предоставлены настоящим изобретением.

Подходящие способы продукции рекомбинантных белков известны в данной области, см. например, Sambrook and Russell (eds.), *Molecular cloning*, third edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Сходным образом, подходящие способы продукции антител известны в данной области и включают такие, описанные, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Harlow and Lane: *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)), US 4376110 и Ausubel et al., eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N.Y., (1987, 1992). Моноклональные антитела можно получать с помощью гибридомных способов, описанных впервые в Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), или с помощью других хорошо известных впоследствии разработанных способов (см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Гибридомы полезны для продукции анти-CD38 антител согласно настоящему изобретению также предоставлены настоящим изобретением. Такие гибридомы можно получать с помощью химического слияния, электрического слияния или любой другой подходящей техники с любым подходящим типом миеломы, гетеромиеломы, фобластоидной клетки, плазматомы или других их эквивалентов и любого подходящего типа клетки, экспрессирующей антитела. Трансформированные бессмертные В-клетки можно также применять для эффективной продукции антител согласно настоящему изобретению и они также предоставлены настоящим изобретением. Такие клетки можно получать с помощью стандартных техник, например, трансформации вирусом Эпштейн-Барра или трансформирующего гена (см., например, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawski, V.R. et al., in *Monoclonal Antibodies*, ed. by Kennett R.H. et al., Plenum Press, N.Y. 1980, pp. 19-33). Так, устойчивые и непрерывные и/или бессмертные клетки и клеточные линии, экспрессирующие анти-CD38 антитела, являются свойством настоящего изобретения. Эукариотические и прокариотические клетки (например, дрожжевые клетки, непрерывные и/или бессмертные линии клеток млекопитающих (например, клеточные линии производные лимфоидных продуцирующих антитела клеток), растительные клетки, клетки насекомых и бактериальные клетки, например клетки *E. Coli* и т.д.), включающие CD38BP-кодирующие или кодирующие фрагмент CD38BP нуклеиновые кислоты, предоставлены настоящим изобретением. Трансгенные животные, например нечеловеческие приматы, грызуны (например, хомячки, морские свинки и крысы, включая их модифицированные штаммы, например мыши с агаммаглобулинемией швейцарского типа (SCID) и другие иммуноотягощенные штаммы животных), собаки и т.д., экспрессирующие анти-CD38 антитела человека, также предоставлены настоящим изобретением.

Рекомбинантные клетки, включающие экзогенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CD38BP, можно получать с помощью любой подходящей техники (например, трансфекции/трансформации голый ДНК плазмидного вектора, вирусным вектором, вектором инвазивной бактериальной клетки и другими векторами целых клеток и т.д., включающими CD38BP-кодирующую последовательность (или последовательности), доставляемые в клетку с помощью облегченной преципитации с фосфатом кальция, трансфекции, опосредованного рецептором нацеливания и трансфекции, биолистической доставки, электропорации, опосредованной декстраном трансфекции, опосредованной липосомами трансформации, слияния протопластов, прямой микроинъекции и т.д.). Способы трансформации/трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2d Edition, 1989 and 3rd Edition, 2001) and F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987). Такие рекомбинантные клетки являются свойством настоящего изобретения.

Клеточные линии, доступные в качестве хозяев для экспрессии рекомбинантных белков, хорошо известны в данной области и включают много бессмертных клеточных линий, доступных в Американской коллекции типов культур (ATCC). Они включают *inter alia* клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, SP2 клетки, HeLa клетки, клетки почек карликового (baby) хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночноклеточной карциномы человека (например, Hep G2), A549 клетки и большое число других клеточных линий. Другими клеточными линиями, которые можно применять, являются линии клеток насекомых, например Sf9 клетки. Когда нуклеиновые кислоты (или содержащие нуклеиновые кислоты векторы), кодирующие белки, например CD38BP (включая анти-CD38 антитела), вводят в клетки хозяина млекопитающего, белки, например CD38BP, можно продуцировать посредством культивирования клеток хозяина в течение периода времени, достаточного для экспрессии белка, например CD38BP, в клетках хозяина или для секреции белка, например CD38BP в культуральную среду, в которой клетки хозяина растут. CD38BP можно получить из культуральной среды с применением стандартных способов очистки белка. CD38BP можно также выделить из лизатов клеток хозяина, когда они экспрессируются прямо без секреторного сигнала.

CD38BP, например анти-CD38 антитела, можно также продуцировать в бактериальных клетках и эукариотических одноклеточных организмах, например дрожжах. Бактериальные клетки, продуцирующие CD38BP, например анти-CD38 антитела, обычно лишены нормального гликозилирования и бактериальные клетки, продуцирующие анти-CD38 антитела, могут таким образом быть более или менее дефицитными в терминах ADCC функций и других аспектов иммунного ответа, связанного с анти-CD38 антителами, продуцируемыми в клетках млекопитающих и/или животных (например, привлечение NK-клеток). Дрожжевые клетки, продуцирующие CD38BP, например анти-CD38 антитела, обычно проявляют другие типы гликозилирования, чем у антител, продуцированных в клетках млекопитающих. Однако способы продукции антител с эффективным гликозилированием в дрожжах в настоящее время развиваются такими компаниями, как Glycofi, Inc. (Lebanon, NH, USA). See also Wildt S. et al., *Nat. Rev. Microbiol.* 3(2), 119-28 (2005).

Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены CD38BP (включая гены анти-CD38 антител), вводят в клетку хозяина млекопитающего, CD38BP продуцируют посредством культивации клеток хозяина в течение периода времени, достаточного для экспрессии CD38BP в клетках хозяина или для секреции антитела в культуральную среду, в которой клетки хозяина растут. Очистки антител и других CD38BP из клеточных культур, клеточных лизатов и животных (например, асцитной жидкости трансгенного животного, продуцирующего анти-CD38 антитела) можно осуществлять с приложением большого числа разных техник, известных в данной области, включая, например, очистку на иммуноаффинных колонках, осаждение сульфатом, хроматофокусировку, препаративный электрофорез (SDS-PAGE) и т.п.

Моноклональные антитела человека согласно настоящему изобретению можно также продуцировать с помощью разнообразных техник, включая общепринятую методологию моноклональных антител, например стандартную технику соматической гибридизации клеток по Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495 (1975). Другие техники получения моноклональных антител также можно применять, например, техники фагового дисплея с применением библиотек генов антител человека. В одном варианте реализации анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению продуцируют с применением гибридомы, образованной в мышинной системе. Гибридомная продукция у мыши является общепринятой процедурой. Протоколы иммунизации и техники выделения иммунизированных клеток селезенки для слияния известны в данной области техники. Партнеры слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедура слияния известны также.

Для получения целиком человеческих моноклональных антител к CD38 можно иммунизировать трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены иммуноглобулинов человека (например, HCo12, HCo7 или KM мышей) обогащенным препаратом CD38 антигена и/или клеток, экспрессирующих CD38, как описано, например, в Lonberg et al., (1994), *supra*, Fishwild et al., (1996), *supra*, и WO 98/24884. Альтернативно, мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей CD38 человека. Мыши могут быть 6-16 недель от роду во время первой инфузии. Например, обогащенный препарат (5-50 мкг) CD38 антигена можно применять для иммунизации NuMAb мышей внутрибрюшинно. В том случае, если иммунизация с применением очищенного или обогащенного препарата CD38 антигена не приводит к выработке антител, мышей можно также иммунизировать клетками, экспрессирующими CD38, например клеточной линией, для ускорения иммунных ответов.

Накопительный опыт с различными антигенами показал, что NuMAb трансгенные мыши отвечают наилучшим образом, когда вначале иммунизированы внутрибрюшинно (i.p.) или подкожно (s.c.) экспрессирующими CD38 клетками в полном растворителе Фрейнда (Freund's adjuvant) с последующими i.p. иммунизациями через неделю (всего до 10) CD38 экспрессирующими клетками в PBS. За иммунным ответом можно следить по ходу протокола иммунизации с помощью образцов плазмы, полученных посредством ретроорбитального кровотоечения. Плазму можно подвергать скринингу с помощью FACS анализа и мышей с достаточным титром анти-CD38 иммуноглобулина человека можно применять для слияния. Мышей можно стимулировать внутривенно CD38-экспрессирующими клетками, например, в течение 4 и 3 дней до забивания и удаления печени.

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к CD38 человека, клетки селезенки и клетки лимфатического узла от иммунизированных мышей можно выделять и соединять подходящей бессмертной клеточной линией, например линией клеток мышинной миеломы. Образующиеся гибридомы можно затем подвергать скринингу на продукцию антиген-специфичных антител. Например, суспензии одиночных клеток селезеночных лимфоцитов из иммунизированных мышей можно соединить с SP2/0 несекретирующими клетками миеломы мыши (ATCC, CRL 1581) с помощью 50% ПЭГ (вес./об.). Клетки можно рассадить при приблизительно 1×10^5 на ячейку на плоскостонную микротитровую плату с последующей инкубацией в течение двух недель в селективной среде, содержащей помимо обычных реагентов 10% сыворотки клона плода, 5-10% оригинального фактора клонирования гибридомы (IGEN) и 1X HAT (Sigma). Через приблизительно две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменен на HT. Отдельные ячейки можно затем подвергать скринингу с помощью ELISA на антитела, содержащие к-легкую цепь человека и с помощью FACS анализа, применяя CD38-

экспрессирующие клетки на CD38 специфичность. Как только происходит обширный рост гибридомы, среду можно проверять обычно через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы можно пересевать, снова подвергать скринингу и при условии сохранения положительности относительно человеческих иммуноглобулинов, можно субклонировать анти-CD38 моноклональные антитела, по меньшей мере, дважды с помощью ограниченного разведения. Устойчивые субклоны можно затем культивировать *in vitro* для получения антитела в среде культуры ткани для характеристики.

Антитела человека согласно настоящему изобретению можно также продуцировать в клетке хозяина трансфектомы, применяя, например, комбинацию рекомбинантных техник ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно в данной области, см., например, Morrison, S., Science 229, 1202 (1985).

Например, для экспрессии антител или фрагментов антител ДНК, кодирующие части или полно-размерные тяжелую и легкую цепи можно получать с помощью стандартных техник молекулярной биологии (например, ПЦР амплификации, направленного мутагенеза) и можно вставлять в экспрессирующие векторы, так что гены оказываются оперативно связанными с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В этом контексте термин "оперативно связан" означает, что ген антитела легирован в вектор так, что последовательности транскрипционного и трансляционного контроля вектора выполняют функции, для которых они предвидены, в регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой хозяина, применяемой для экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно помещать в отдельные векторы или, более типично, оба гена помещают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антител можно вставлять в экспрессирующий вектор с помощью стандартных способов (например, легирования комплементарных участков рестрикции во фрагмент гена антитела и вектор или легирования тупых концов, если нет участков рестрикции). Вариабельные участки легкой и тяжелой цепей антител, описанные в настоящей заявке, можно применять для создания полноразмерных генов антител любого изотипа антитела посредством вставки их в экспрессирующие векторы, которые уже кодируют константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи нужного изотипа, например V_H сегмент оперативно связан с C_H сегментом(ами) внутри вектора, и V_L сегмент оперативно связан с C_L сегментом внутри вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, облегчающий секрецию цепи антитела из клетки хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор, так что сигнальный пептид связан в рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (например, сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

В дополнение к генам цепей антитела рекомбинантные экспрессирующие векторы согласно настоящему изобретению несут регуляторные последовательности, которые позволяют контролировать экспрессию генов цепей антитела в клетке хозяина.

В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессирующие векторы согласно настоящему изобретению могут нести дополнительные последовательности, например последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетке хозяина (например, начало репликации) и гены маркеров отбора. Гены маркеров отбора облегчают селекцию клеток хозяина, в который вектор попал (см., например, US 4399216, US 4634665 и US 5179017). Например, обычно гены маркеров отбора придают устойчивость к лекарствам, например G418, гигромицину или метотрексату у клетки хозяина, в которую ввели вектор. Примеры генов маркеров отбора включают ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетке хозяина при селекции с помощью метотриксата/амплификации) и ген нео (neo) (для селекции с G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессирующие векторы, кодирующие тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку хозяина с помощью стандартных техник. Клетки хозяина могут быть прокариотическими или эукариотическими клетками хозяина, например клетками млекопитающих. Например, антиген-связывающие фрагменты можно экспрессировать в прокариотических клетках хозяина и полноразмерные антитела можно экспрессировать в эукариотических клетках хозяина.

В одном варианте реализации антитела экспрессируют в эукариотических клетках хозяина, например клетках млекопитающих. Примеры клеток хозяина млекопитающего для экспрессии рекомбинантных антител согласно настоящему изобретению включают клетки CHO (включая dhfr-CHO клетки, описанные в Urlaub and Chasin, PNAS USA 77, 4216-4220 (1980), применяемые с маркером селекции DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp, Mol. Biol. 159, 601-621 (1982)), NS/O клетки миеломы, COS клетки, HEK293 клетки и SP2.0 клетки. В частности, для применения с NS/O клетками миеломы другим примером системы экспрессии является система экспрессии гена GS (глутамин синтетазы), как раскрыто в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338 841.

Гены CD38BP можно экспрессировать в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, например микроорганизмы, например *E. coli* для продукции scFv антител, водоросли, а также клетки насекомых. Далее CD38BP можно продуцировать в трансгенных животных, отличных от человека, например в молоке овец или кроликов, или в куриных яйцах, или в трансгенных растениях. См. например, Verma, R. et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181 (1998), Pollock et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-

157 (1999) and Fischer, R. et al., *Biol. Chem.* 380, 825-839 (1999).

Биспецифичные и мультиспецифичные CD38BP согласно настоящему изобретению можно получать с помощью химических способов (см., например, D.M. Kranz et al., *PNAS USA* 78, 5807 (1981)), техник "полидомы" (см. US 4474893) или техник рекомбинантных ДНК.

Биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению можно получать с помощью разнообразных известных способов, включая слияние гибридом или связывание Fab' фрагментов (см., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79, 315-321 (1990) и Kostelny et al., *J. Immunol.* M8, 1547-1553 (1992)). Традиционно рекомбинантная продукция биспецифичных антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, где у двух тяжелых цепей разные специфичности (см., например, Milstein and Cuello, *Nature* 305, 537 (1983)). Из-за случайного объединения тяжелых и легких цепей такие гибридомы (квадромы) потенциально продуцируют смесь из 10 различных молекул антител, среди которых только одна обладает правильной биспецифичной структурой. Сходные процедуры раскрыты в WO 93/08829 и Traunecker et al., *EMBO J.* 10, 3655 (1991).

Согласно другому подходу вариабельные домены антител с нужными специфичностями связывания (участками, комбинирующими антитело и антиген) соединены с последовательностями константных участков иммуноглобулина с помощью рекомбинантных или химических способов. Последовательность вариабельного домена обычно соединена с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим по меньшей мере часть связки, C_H2 и C_H3 участками. Обычно также, что первый константный участок тяжелой цепи (C_H1), содержащий участок, необходимый для связывания легкой цепи, также присутствует по меньшей мере в одном составном пептиде. В более специфическом примере подхода такого типа продуцируется биспецифичное антитело, включающее гибридную тяжелую цепь иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одной руке и гибридную пару из тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина (предоставляющую вторую специфичность связывания) на другой руке. Такая асимметричная структура может облегчить отделение нужного биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина (например, как описано в WO 94/04690). Более детальное описание получения биспецифичных антител см., например, в Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

При другом подходе поверхность контакта между парой молекул антител может быть построена так, чтобы сделать наибольшим процент гетеродимеров, которые находятся в культуре рекомбинантной клетки, чтобы образовать популяцию молекул биспецифичных антител. Обычно, такая поверхность контакта включает по меньшей мере часть C_H3 домена константного участка антитела. Обычно по такому способу один или более аминокислотный остаток с меньшим размером боковой цепи с поверхности контакта молекулы первого антитела замещают аминокислотным остатком с боковой цепью большего размера (например, тирозином или триптофаном). Соответствующие "пазы" идентичные или близкие по размеру большим боковым цепям аминокислотных остатков создаются на поверхности контакта второй молекулы антитела посредством замещения аминокислотных остатков с большими боковыми цепями на меньшие (например, аланин или треонин). Это может предоставить механизм увеличения выхода гетеродимеров относительно других ненужных конечных продуктов, например, гомодимерами.

Биспецифичные и мультиспецифические молекулы согласно настоящему изобретению можно получать посредством конъюгации специфичностей связывания компонент, например анти-FcR и анти-CD38 специфичностей связывания, с помощью способов, известных в данной области. Например, каждую специфичность связывания биспецифичных и мультиспецифичных молекул можно получить по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичности связывания осуществляются белками или пептидами, можно применять большое разнообразие сопрягающих или сшивающих агентов для ковалентной конъюгации. Примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-наторбензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC), см., например, Karpovsky et al., *J. Exp. Med.* 160, 1686 (1984), Liu, M.A. et al., *PNAS USA* 82, 8648 (1985). В другом примере Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985) описывают способ, где интактные антитела протеолитически расщепляют с получением F(ab')₂ фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии комплексообразующего дитиол агента арсенита натрия, чтобы стабилизировать соседние дитиолы и предотвратить образование внутримолекулярных дисульфидных связей. Полученные Fab' фрагменты можно затем превратить в тионитробензоатные (TNB) производные. Одно из Fab'-TNB производных можно затем превратить опять в Fab'-тиол посредством восстановления меркаптоэтиламино и смешать с эквимольным количеством другого Fab'-TNB производного с образованием биспецифичного антитела. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992) описывает продукцию молекулы целиком гуманизированного биспецифичного антитела F(ab')₂ согласно сходному способу. Другие способы включают описанные в Paulus (Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132 (1985)) and Glennie et al., *J. Immunol.* 139, 2367-2375 (1987). Примерами конъюгирующих агентов являются SATA и sulfo-SMCC, оба доступные у Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичности связывания проявляются антителами, они могут быть конъюгированы через сульфгидрильные группы C-концевых участков связки на двух тяжелых цепях. В одном варианте реали-

зации участок связки модифицирован до конъюгации, чтобы содержать нечетное число сульфгидрильных групп, например одну.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут кодироваться одним и тем же вектором и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке хозяина. Этот способ особенно применим, когда биспецифичные и мультиспецифичные молекулы являются $mAb \times mAb$, $mAb \times Fab$, $Fab \times F(ab')_2$ или лиганд $\times Fab$ составным белком. Биспецифичные и мультиспецифичные молекулы согласно настоящему изобретению могут быть одноцепочечной молекулой, например одноцепочечным биспецифичным антигеном, одноцепочечной биспецифичной молекулой, включающей одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту или одноцепочечной биспецифичной молекулой, включающей две связывающие детерминанты. Биспецифичные и мультиспецифичные молекулы могут также быть одноцепочечными молекулами или могут включать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения би- и мультиспецифичных молекул описаны, например, в US 5260203, US 5455030, US 4881175, US 5132405, US 5091513, US 5476786, US 5013653, US 5258498 и US 5482858.

Различные техники получения и выделения биспецифичных фрагментов антител прямо из культур рекомбинантных клеток также описаны. Например, биспецифичные антитела можно получать с помощью лейциновой застежки (см., например, Kostelny et al., J. Immunol. 148(5), 1547-1553 (1992)). Пептиды лейциновой застежки из Fos и Jun белков связывают с Fab' частями двух различных антител посредством соединения генов и получающиеся гомодимеры антител восстанавливают в участке связки с образованием мономеров, которые можно опять окислить с образованием гетеродимеров антитела. Технология "диатела", описанная Hollinger et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), также предоставляет альтернативный механизм получения биспецифичных фрагментов антитела. Другая стратегия получения биспецифичных фрагментов антитела с применением одноцепочечных Fv (sFv) димеров также описана. См., например, Gruber et al., J. Immunol. 152, 5368 (1994).

К тому же биспецифичные антитела можно образовывать как "диатела" (Hollinger et al., PNAS USA, 90, 6444-6448 (1993)) или "Янусины" ("Janusins") (Trautnecker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991) и Trautnecker et al., Int. J. Cancer. Suppl. 7, 51-52 (1992)). Биспецифичные антитела по определению не существуют в форме фрагментов, обладающих одиночным участком связывания (например, Fab, Fab' и Fv фрагменты, которые также предоставлены настоящим изобретением).

Связывание биспецифичных и мультиспецифичных молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать с помощью связанного с ферментом иммуносорбентного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), FACS анализа, биоанализа (например, ингибирования роста) или блоттинга (Western Blot Assay). Каждый из этих аналитических подходов, по существу, детектирует присутствие искомого комплекса белок-антитело с помощью метящего реагента (например, антитела), специфичного для искомого комплекса. Например, комплексы FcR-антитело можно детектировать с помощью, например, связанного с ферментом антитела или фрагмента антитела, который узнает и специфически связывается с комплексами FcR-антитело.

Альтернативно, комплексы можно детектировать с помощью большого числа других иммуноанализов. Например, антитело можно радиоактивно пометить и применять в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). Радиоактивный изотоп можно детектировать такими способами, как γ -счетчик, или сцинтилляционный счетчик, или ауторадиография.

Как утверждалось выше, антитела взаимодействуют с мишенями антигенами первично через аминокислотные остатки, находящиеся в шести участках тяжелых и легких цепей, определяющих комплементарность (CDR). Настоящее изобретение обеспечивает антитела, обладающие CDR участками, идентичными или производными CDR участков -003 или -005 или -024. Такие антитела можно получать посредством конструкции экспрессирующих векторов, включающих последовательности CDR из -003 или -005 или -024, помещенные в каркасные последовательности из различных антител с различными свойствами.

Такие каркасные последовательности можно получить из общедоступных баз данных, включающих последовательности генов антител зародышевых линий. Эти последовательности зародышевых линий отличаются от зрелых последовательностей генов антител, потому что они не включают полностью собранные вариабельные гены, которые образуются посредством V(D)J соединения во время созревания В-клеток. Последовательности зародышевых линий также отличаются от последовательностей вторичного набора антитела высокого сродства, которые содержат мутации по всему вариабельному гену, но обычно расположенные кластерами в CDR. Например, соматические мутации относительно редки в аминоконцевом отделе каркасного участка 1 и в карбоксиконцевом отделе каркасного участка 4. По этой причине не требуется получать всю последовательность ДНК данного антитела, чтобы воссоздать интактное рекомбинантное антитело, обладающее связывающими свойствами, сходными с исходным антителом (см. WO 99/45962). Частичные последовательности тяжелой и легкой цепи, охватывающие CDR участки, обычно достаточны для этой цели. Неполная последовательность применяется для определения того, какие вариабельные и соединительные сегменты гена зародышевые линии вносят вклад в вариабельные

гены рекомбинантного антитела. Последовательности зародышевой линии затем применяются для заполнения пустующих участков в переменных участках. Лидерные последовательности тяжелой и легкой цепи отщепляются при созревании белка и не вносят вклад в свойства конечного антитела. Чтобы добавить отсутствующие последовательности, клонированные последовательности кДНК можно комбинировать с синтетическими олигонуклеотидами посредством лигирования или ПЦР амплификации. Альтернативно, весь переменный участок можно синтезировать в виде набора коротких перекрывающихся олигонуклеотидов и комбинировать с помощью ПЦР амплификации для создания клона целиком синтетического переменного участка. Этот процесс отличается определенными преимуществами, например удалением или введением отдельных участков рестрикции или оптимизацией отдельных кодонов.

Нуклеотидные последовательности транскриптов тяжелой и легкой цепей из гибридом применяют для создания набора перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов для создания синтетических V последовательностей с возможностями кодирования аминокислот идентичными природным последовательностям. Синтетические последовательности тяжелой и к-цепи могут отличаться от природных последовательностей по трем пунктам: протяженности повторяющихся нуклеотидных оснований прерыва- ны, чтобы облегчить синтез олигонуклеотидов и ПЦР амплификацию; включены участки оптимальной инициации трансляции согласно правилам Козака (Kozak, J. Biol. Chem. 266, 19867-19870 (1991)); и HindIII участки вставлены выше участков инициации трансляции.

Для переменных участков как тяжелой, так и легкой цепей оптимизированные кодирующие и соответствующие некодирующие цепочки последовательностей разорваны на 30-50 нуклеотидов приблизительно в средней точке соответствующего некодирующего олигонуклеотида. Таким образом, для каждой цепи олигонуклеотиды могут собраться в перекрывающиеся двухцепочечные наборы, которые охватывают сегменты из 150-400 нуклеотидов. Набор затем применяют в качестве матриц для получения продукта ПЦР амплификации из 150-400 нуклеотидов. Обычно один набор одноцепочечных олигонуклеотидов переменного участка разбивают на две части, которые отдельно амплифицируют для получения двух перекрывающихся ПЦР продуктов. Такие перекрывающиеся продукты затем комбинируют посредством ПЦР амплификации для образования полного переменного участка. Может быть также желательно включить перекрывающийся фрагмент константного участка тяжелой или легкой цепи (включая BbsI участок к-легкой цепи или AgeI участок γ-тяжелой цепи) в ПЦР амплификации для получения фрагментов, которые легко клонировать в конструкции экспрессирующих векторов.

Реконструированные переменные участки тяжелой и легкой цепи затем комбинируют с последовательностями клонированного промотора, лидера, инициации трансляции, константного участка, 3'-нетранслируемого участка, участка полиаденилирования и терминации транскрипции для образования конструкций экспрессирующего вектора. Экспрессирующие конструкции тяжелой и легкой цепи можно комбинировать в одиночном векторе, котрансфицировать, серийно трансфицировать или отдельно трансфицировать в клетки хозяина и затем объединить для образования клетки хозяина, экспрессирующей обе цепи.

Можно применять сходную процедуру, чтобы привить новую специфичность к антигену на существующее зрелое мышинное антитело. Обычно выбирают антитело акцептор, которое происходит из того же переменного гена зародышевой линии, как и CDR-донорное антитело, но другие акцепторные антитела тоже можно выбирать. Один или более CDR из донорного антитела затем переносят с применением техники, описанной выше.

В одном варианте реализации настоящего изобретения структурные свойства -003 и -005 и -024 применяют для создания структурно родственных анти-CD38 антител, например анти-CD38 антител человека, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство -003 и -005 и -024, а именно, связывание с CD38. Более специфично один или более CDR участок -003 или -005 или -024 можно комбинировать рекомбинантным способом с известными каркасными участками человека и CDR для создания дополнительных, созданных рекомбинантным способом анти-CD38 антител человека согласно настоящему изобретению.

Примеры плазмид для применения в конструкции экспрессирующих векторов для IgGκ человека описаны ниже. Плазмиды сконструированы так, что амплифицированная с помощью ПЦР кДНК последовательности V κ-тяжелой цепи и V κ-легкой цепи можно применять для реконструкции полных минигенов тяжелой и легкой цепи. Такие плазмиды можно применять для экспрессии полностью человеческих IgG1, κ или IgG4, κ антител. Сходные плазмиды можно конструировать для экспрессии других изотипов тяжелой цепи или для экспрессии антител, включающих λ-легкие цепи.

CD38BP согласно настоящему изобретению, например, анти-CD38 антитела человека согласно настоящему изобретению можно выделять и характеризовать с помощью большого числа различных способов. Например, выбранные гибридомы можно выращивать в подходящих флаконах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно затем фильтровать и концентрировать перед афинной хроматографией с протеин-A-сефарозой (для антител изотипа IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) или покрытой противочеловеческим IgG сефарозой или протеин-G-сефарозой в случае антител изотипа IgG3. Элюированные IgG можно поверять с помощью гель-электрофореза и жидкостной хроматографии высокого раз-

решения для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS и концентрацию можно определять по OD₂₈₀, применяя коэффициент экстинкции 1.43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Чтобы определить, связываются ли выбранные CD38BP, например анти-CD38 моноклональные антитела человека, с уникальными эпитопами, можно применять сайт-направленный или мультисайт-направленный мутагенез.

Для определения изотипа очищенного антитела можно проводить изотип ELISA. Ячейки микротитровых плат можно покрывать 10 мкг/мл античеловеческого Ig в течение ночи при 4°C. После блокирования 5% БСА (бычьим сывороточным альбумином) платы подвергают реакции с 10 мкг/мл моноклональных антител или очищенного изотипа контроля при комнатной температуре в течение 2 ч. Ячейки можно затем подвергать реакции с IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgE, IgA1, IgA2 человека или со специфическими к IgM человека пробами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. После промывки платы проявляют с помощью pNPP субстрата (1 мг/мл) и анализируют по оптическому поглощению при 405 нм.

Для демонстрации присутствия анти-CD38 антител в сыворотке иммунизированной мыши или связывания CD38BP (включая анти-CD38 антитела) с живыми клетками, экспрессирующими CD38, можно применять проточную цитометрию. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие CD38 (выращенные в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями CD38BP в PBS, содержащем 0,1% БСА и 0,02% азида натрия, и инкубируют при 4°C в течение 30 мин. После промывки клетки подвергают реакции с меченым флуоресцеином античеловеческим IgG антителом в тех же условиях, как взаимодействие с первичным антителом. Примеры можно анализировать с помощью проточной цитометрии, применяя проточный цитометр (например, Becton Dickinson FACS instrument), применяя свет и свойства бокового светорассеяния для настройки прибора на одиночную живую клетку. В качестве альтернативного анализа можно применять флуоресцентную микроскопию дополнительно или вместо проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и анализировать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет наблюдать отдельные клетки, но обладает уменьшенной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

CD38BP, например анти-CD38 IgG человека, можно далее тестировать на реактивность с CD38 антигеном с помощью блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих CD38, можно получать и подвергать электрофорезу в полиакриламидном геле с ДСН. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% нежирным молоком и тестируют с CD38BP. Связывание IgG человека можно детектировать с применением античеловеческого IgG со щелочной фосфатазой и проявлять с помощью таблетированного субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), а также можно применять детектирующие агенты, направленные на другие специфические части CD38BP.

В дополнение к специфическому связыванию с CD38 CD38BP (включая анти-CD38 антитела человека) можно тестировать на их способность ингибировать различные активности клеток, экспрессирующих CD38, например, но не ограничиваясь этим, продукцию инсулина, высвобождение Ca²⁺, продукцию цитокинов, индукцию лизиса и пролиферации.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает трансгенных и трансхромосомных животных отличных от человека, например трансгенных и трансхромосомных мышей, способных экспрессировать антитела человека, которые специфически связываются с CD38. В отдельном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает трансгенную или трансхромосомную мышь, обладающую геномом, включающим трансген тяжелой цепи человека, так что мышь продуцирует анти-CD38 антитела при иммунизации клетками, экспрессирующими CD38. Трансген тяжелой цепи человека может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных, например, NuMAb мышей, как детально описано в настоящей заявке. Альтернативно, трансген тяжелой цепи человека можно поддерживать внехромосомно, как в случае трансхромосомных мышей (например, KM), как описано в WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные животные способны продуцировать множественные изотипы моноклональных антител человека к CD38 (например, IgG, IgA и/или IgE), претерпевая V-D-J/V-J рекомбинацию и переключение изотипов. Создание трансгенных и трансхромосомных животных, отличных от человека, которые отвечают на стимуляцию чужеродным антигеном, продуцируя гетерологичный набор антител, требует, чтобы трансгены гетерологичных иммуноглобулинов, содержащиеся внутри трансгенного животного, функционировали правильно по ходу развития В-клеток. Это включает, например, переключение изотипа трансгена гетерологичной тяжелой цепи человека. Соответственно, трансгены построены так, чтобы переключение изотипа можно было индуцировать, и проявлялась одна или более из следующих характеристик генов антитела: (1) высокий уровень и специфичная к типу клетки экспрессия, (2) перестройка функционального гена, (3) активация ответа на исключение аллели, (4) экспрессия достаточного первичного набора, (5) передача сигнала, (6) соматическая гипермутация и (7) преобладание локуса трансгенного антитела во время иммунного ответа.

Не все из вышеперечисленных критериев надо выполнять. Например, в таких вариантах реализации, где локусы эндогенного иммуноглобулина трансгенного животного функционально нарушены, трансгену не надо активировать исключение аллеля. Далее в таких вариантах реализации, когда трансген

включает функционально перестроенный ген тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина, второй критерий функциональной перестройки гена не является обязательным, по крайней мере, для такого трансгена, который уже перестроен. Основы молекулярной иммунологии см. в *Fundamental Immunology*, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

В некоторых вариантах реализации трансгенные или трансхромосомные животные, отличные от человека, применяемые для получения моноклональных антител человека согласно настоящему изобретению, содержат перестроенные, неперестроенные и комбинацию перестроенных и неперестроенных трансгенов тяжелой и легкой цепи гетерологичных иммуноглобулинов в зародышевой линии трансгенных животных. Каждый из трансгенов тяжелой цепи включает по меньшей мере один C_H ген. Дополнительно трансген тяжелой цепи может включать последовательности функционального переключения изотипа, способные поддерживать переключение изотипа гетерологичного трансгена, кодирующего множественные C_H гены в В-клетках трансгенного животного. Такие последовательности переключения могут быть таковыми, встречающимися естественным образом в локусе иммуноглобулина зародышевой линии из видов, служащих источником трансгенных C_H генов, или такие последовательности переключения могут быть произведены из таковых, встречающихся у видов, которые должны получить трансгенную конструкцию (трансгенных животных). Например, конструкция трансгена человека, которая применяется для получения трансгенной может давать более высокую частоту событий переключения изотипа, если она включает последовательности переключения, сходные с таковыми, встречающимися в природе в локусе тяжелой цепи мыши, поскольку очевидно, что мышинные последовательности переключения оптимизированы для работы с мышинной системой рекомбиназных ферментов переключения, в то время как последовательности переключения человека нет. Последовательности переключения можно выделять и клонировать с помощью общепринятых способов или можно синтезировать *de novo* из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов, созданных на основе опубликованной информации о последовательностях, относящихся к последовательностям участков переключения иммуноглобулинов (Mills et al., *Nucl. Acids Res.* 15, 7305-7316 (1991) Sideras et al., *Intl. Immunol.* 1, 631-642 (1989)). Для каждого из вышеперечисленных трансгенных животных трансгены функционально перестроенных гетерологичных тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина обнаружены в значительной фракции В-клеток трансгенного животного (по меньшей мере 10%).

Трансгены, применяемые для получения трансгенных животных, отличных от человека, согласно настоящему изобретению включают трансген тяжелой цепи, включающий ДНК, кодирующую по меньшей мере один вариабельный сегмент гена, один сегмент разнообразия, один соединительный сегмент гена и по меньшей мере один сегмент константного участка гена. Трансген легкой цепи иммуноглобулина включает ДНК, кодирующую по меньшей мере один вариабельный сегмент гена, один соединительный сегмент гена и по меньшей мере один сегмент константного участка гена. Сегменты гена, кодирующие легкую и тяжелую цепи, являются гетерологичными для трансгенного животного, в котором они получены, или соответствуют ДНК, кодирующей сегменты гена легкой и тяжелой цепи из видов, не включающих трансгенное животное, отличное от человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения трансген составлен так, что индивидуальные сегменты гена не перестроены, т.е. не перестроены так, чтобы кодировать функциональную легкую или тяжелую цепь иммуноглобулина. Такой неперестроенный трансген поддерживает рекомбинацию V, D и J сегментов гена (функциональную перестройку) и может поддерживать включение всего или части D участка сегмента гена в получающуюся перестроенную тяжелую цепь иммуноглобулина у трансгенного животного при воздействии CD38 антигена.

В альтернативном варианте реализации трансгены включают неперестроенный "минилокус". Такие трансгены обычно включают значительную часть C, D и J сегментов, а также поднабор сегментов V гена. В таких трансгенных конструкциях различные регуляторные последовательности, например промоторы, усилители, участки переключения классов, последовательности доноров при сплайсинге и акцепторов при сплайсинге для получения РНК, сигналы рекомбинации и т.п., включают соответствующие последовательности, произведенные из гетерологичных ДНК. Такие регуляторные последовательности могут быть включены в трансген из того же или родственного вида животного, отличного от человека, применяемого согласно настоящему изобретению. Например, сегменты гена иммуноглобулина человека можно комбинировать в трансгене с последовательностью усилителя из грызуна для применения в трансгенной мыши. Альтернативно, в трансген можно включать синтетические регуляторные последовательности, где такие синтетические регуляторные последовательности не являются гомологичными функциональной последовательности ДНК, которая, как известно, находится естественным образом в геноме млекопитающих. Синтетические регуляторные последовательности создаются согласно общепринятым правилам, например, содержащим допустимые последовательности участка акцептора при сплайсинге или мотив промотора/усилителя. Например, минилокус включает часть геномного локуса иммуноглобулина, обладающего, по меньшей мере, одной внутренней (например, не на конце части) делецией несущественной части ДНК (например, промежуточной последовательности, интрона или его части) по сравнению с встречающимися в природе локусом иммуноглобулина зародышевой линии.

Примеры трансгенных и трансхромосомных животных отличных от человека, например мыши,

проявляют продукцию иммуноглобулина со значительным разнообразием в идеале, по существу, сходную с таковой у человека после приведения к объему.

Набор/разнообразие идеально приблизится к таковому, показанному у человека, когда после приведения к объему проявляет отклонение по меньшей мере приблизительно 10%, например 25-50% или более. Обычно продуцируется по меньшей мере тысяча разных иммуноглобулинов (в идеале IgG), например 10^4 - 10^6 или более в зависимости от числа различных V, J и D участков, введенных в геном мыши и управляемых дополнительного разнообразия, образованного перестройками V(-D)-J сегмента гена и случайными добавлениями нуклеотидов в участках соединения. Обычно иммуноглобулины проявляют сродство (K_d) для предварительно отобранных антигенов ниже 10^{-8} М, например ниже 10^{-9} М, 10^{-10} М или 10^{-11} М или еще ниже. Трансгенные и трансхромосомные животные, отличные от человека, например мыши, как описано выше, могут быть иммунизированы, например, клетками, экспрессирующими CD38. Альтернативно, трансгенные животные могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей CD38 человека. Животные при этом будут продуцировать В-клетки, которые претерпевают переключение класса посредством переключающей рекомбинации (cis-переключение) и экспрессируют иммуноглобулины, реактивные с CD38. Иммуноглобулины являются антигенами человека (называемыми также "антигенами последовательностей человека"), где полипептиды тяжелой и легкой цепей кодируются последовательностями трансгена человека, которые могут включать последовательности, произведенные посредством соматической мутации и рекомбинаторных присоединений V участков, а также последовательностями из зародышевой линии; такие антитела человека можно называть, по существу, идентичными полипептидной последовательности, кодируемой V_L и J_L или V_H , D_H и J_H сегментами гена, даже если другие последовательности не из зародышевой линии могут присутствовать в результате соматической мутации и различных V-J и V-D-J рекомбинационных соединений. Варибельные участки каждой цепи антитела обычно по меньшей мере на 80% сходны с V и J сегментами генов зародышевой линии человека и в случае тяжелых цепей, V, D и J сегментами зародышевой линии человека; часто по меньшей мере на 85% сходны с последовательностями зародышевой линии человека, присутствующими в трансгене, часто на 90 или 95% сходны с последовательностями зародышевой линии человека, присутствующими в трансгене. Однако поскольку последовательности не из зародышевой линии включены посредством соматических мутаций и VJ и VDJ соединения, антитела последовательностей человека часто будут иметь некоторые последовательности варибельного участка, которые не кодируются V, D или J сегментами гена человека, как обнаружено в трансгене(нах) человека в зародышевой линии мыши. Обычно такие последовательности не зародышевой линии (или отдельные положения нуклеотидов) группируются в или близости от CDR или в участках, где, как известно, группируются соматические мутации.

Настоящее изобретение также предоставляет В-клетки, произведенные из трансгенных или трансхромосомных животных, как описано в настоящей заявке. В-клетки можно применять для получения гибридом, экспрессирующих моноклональные антитела человека, которые связываются с высоким сродством (например, с константой диссоциации (K_d) ниже 10^{-8} М) с CD38 человека. Так, в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает гибридому, которая продуцирует антитела человека со сродством (K_d) ниже 10^{-8} М, например ниже 10^{-9} М, ниже 10^{-10} М или 10^{-11} М или еще ниже при определении с помощью анализа Скэтчардау клеток, экспрессирующих CD38, с применением радиоактивно-меченого моноклонального антитела, или с помощью определения полумаксимальной концентрации связывания с применением FACS анализа, или с помощью анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса, как измеряют с помощью прибора BIAcore.

Настоящее изобретение обеспечивает анти-CD38 антитело, включающее последовательность легкой цепи человека, состоящую из (1) варибельного участка легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая, по существу, идентична полипептидной последовательности, кодируемой V_L сегментом гена человека и J_L сегментом человека, и (2) константного участка легкой цепи, кодируемого C_L сегментом гена человека и последовательность тяжелой цепи человека, состоящую из (1) варибельного участка тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая, по существу, идентична полипептидной последовательности, кодируемой V_H сегментом гена человека, D участком и J_H сегментом человека, и (2) константного участка, кодируемого C_H сегментом гена человека. Следует заметить, что D гены человека могут быть значительно изменены посредством рекомбинаций и соматических мутаций, так что исходные последовательности зародышевой линии человека могут не быть легко узнаваемыми.

Развитие моноклональных антител человека с высоким сродством против CD38 можно облегчить с помощью способа для расширения набора сегментов варибельного участка гена у трансгенных животных отличных от человека, обладающих геномом, включающим интегрированный трансген иммуноглобулина человека, упомянутый способ включает введение в геном трансгена V гена, включающего сегменты гена V участка, которые отсутствуют у упомянутого интегрированного трансгена иммуноглобулина человека. Часто трансген V участка является дрожжевой искусственной хромосомой (YAC), включающей часть матрицы (аггау) V_H или V_L (V_K) сегментов гена человека, которая может присутствовать естественным образом в геноме человека или может быть объединена посредством сплайсинга с помощью рекомбинантных способов, которые могут включать неисправные или пропущенные V сегменты гена. Часто по меньшей мере пять или более функциональных V сегментов гена содержатся в YAC. В

этом варианте возможно сделать трансгенное животное, полученное с помощью способов расширения V набора, где животное экспрессирует цепь иммуноглобулина, включающую последовательность вариабельного участка, кодируемую V участком сегмента гена, присутствующим в трансгене V участка, и C участком, кодируемым трансгеном иммуноглобулина человека. С помощью способа расширения V набора можно получить трансгенных животных, обладающих по меньшей мере пятью различными V генами, а также животных, содержащих по меньшей мере приблизительно 24 V гена или больше. Некоторые V сегменты гена могут быть нефункциональными (например, псевдогены и т.п.); эти сегменты можно оставить или можно избирательно удалить с помощью рекомбинантных способов, доступных специалистам в данной области, если требуется.

Как только создана зародышевая линия мыши, содержащая функциональный YAC, обладающий расширенным набором V сегмента, по существу, отсутствующего в трансгене иммуноглобулина человека, содержащем J и C сегменты гена, эту черту можно распространить и размножить на других генетических фонах, включая фоны, где функциональный YAC, обладающий расширенным набором V сегмента, размножают в зародышевой линии животного, отличного от человека, обладающего другим трансгеном иммуноглобулина человека. Множественные функциональные YAC, обладающие расширенным набором V сегмента, можно размножить в зародышевой линии, чтобы работать с трансгеном иммуноглобулина человека (или множественными трансгенами иммуноглобулина человека). Хотя они в настоящей заявке и называются YAC трансгенами, такие трансгены при интеграции в геном могут в значительной степени утрачивать последовательности дрожжей, например последовательности, необходимые для автономной репликации в дрожжах, такие последовательности можно при необходимости удалить с помощью подходов генной инженерии, (например, переваривания рестриктазами и электрофореза в импульсном поле или других подходящих способов) после репликации в дрожжах они больше не требуются (например, перед введением в ES клетку мыши или мышиную прозиготу). Способы распространения признака экспрессии последовательности иммуноглобулина человека включают разведение трансгенных животных, несущих трансген(ы) иммуноглобулина человека, и при необходимости имеющие также функциональные YAC с расширенным набором V сегментов. Оба сегмента гена V_L и V_H могут присутствовать в YAC. Трансгенное животное можно разводить на любом фоне, выбранном практиком, включая фоны, несущие другие трансгены человека, включая трансген иммуноглобулина человека и/или трансгены, кодирующие другие белки лимфоцитов человека. Настоящее изобретение также предоставляет последовательность иммуноглобулина человека с высоким сродством, продуцируемого трансгенной мышью, несущей YAC трансген с расширенным набором V участка. Хотя выше описано специфический вариант трансгенного животного согласно настоящему изобретению, также рассматриваются другие варианты реализации, классифицированные по трем категориям:

- (1) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с перестроенной тяжелой и перестроенной легкой цепью;
- (2) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с перестроенной тяжелой и перестроенной легкой цепью;
- (3) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с перестроенной тяжелой и перестроенной легкой цепью.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую терапевтически активное количество CD38BP согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с другими известными вспомогательными веществами и наполнителями в соответствии с общепринятыми способами, как раскрытые в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995.

Фармацевтически приемлемые носители или разжижители, а также другие известные вспомогательные вещества и наполнители должны подходить для выбранного соединения согласно настоящему изобретению и избранному способу введения/дачи. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основе отсутствия значительного отрицательного воздействия на нужные биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению (например, меньше, чем значительное воздействие (10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования и т.д.) на связывание антигена.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может также включать растворители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент как Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или очищенные от белка аминокислоты), консерванты, тканевые фиксативы, солубилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Действительные уровни дозировки ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут варьировать так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у данного больного, композиции и способа введения, не будучи токсичным для больного. Выбранный уровень дозировки зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность данной применяемой композиции согласно

настоящему изобретению или ее эфира, соли или амида, пути приема, времени приема, скорости выделения данного примененного соединения, продолжительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с данной применяемой композицией, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни больного на лечении и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическую композицию можно применять любым подходящим способом. Подходящие пути для применения соединения согласно настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны обычными специалистами.

Соединения согласно настоящему изобретению можно давать любым подходящим путем, например, через рот, через нос, посредством ингаляции, топикальным (включая защеchnый, чрезкожный и подъязычный), ректальным, вагинальным и/или парентеральным путем.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению назначают через рот, например, с инертным растворителем или перевариваемым съедобным носителем. Активный ингредиент можно заключать в твердые или мягкие желатиновые капсулы, прессовать в таблетки или прямо включать в диету больного. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, которые подходят для приема через рот, включают таблетки для глотания, защеchnые таблетки, таблетки, капсулы, эликсиры, суспензии, сиропы, вафли и т.п., содержащие носители, которые подходят для данного случая, как известно в данной области. Чтобы давать соединение согласно настоящему изобретению посредством введения через рот, может быть необходимым покрывать соединение или давать соединение вместе с материалом для предотвращения его инактивации.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению назначают через нос. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для введения через нос, известны в данной области техники и обычно включают спреи, капли для носа и ингаляторы.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению применяют топикально. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для топикального или чрескожного применения, известны в данной области техники и обычно включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы, содержащие такие носители, которые подходят для такого случая согласно данной области техники.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению применяют ректально. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для ректального применения, известны в данной области техники и включают гели, пасты, спрейные рецептуры, суппозитории.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению применяют вагинально. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для вагинального применения, известны в данной области техники и обычно включают pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или спрейные рецептуры, содержащие такие носители, которые подходят для такого случая согласно данной области техники.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению назначают парентерально.

Фразы "парентеральное применение" или "назначается парентерально" применяют в настоящей заявке для обозначения способов введения, отличных от энтерального и топикального введения, обычно посредством инъекции, и включают эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрисуставную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидную, интраспинальную, внутричерепную, внутригрудную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию.

В одном варианте реализации такую фармацевтическую композицию назначают посредством внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

В одном варианте реализации соединения согласно настоящему изобретению применяют в кристаллической форме посредством подкожной инъекции, см. Yang et al., PNAS USA 100(12), 6934-6939 (2003).

Фармацевтические композиции можно давать с применением медицинских приспособлений, известных в данной области. Например, в одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно назначать с безыгольными приспособлениями для гиподермической инъекции, как приспособления, раскрытые в US 5399163, US 5383851, US 5312335, US 5064413, US 4941880, US 4790824 или US 4596556. Примеры хорошо известных имплантов и модулей, применимых для настоящего изобретения, включают US 4487603, которые раскрывают имплантируемый микроинфузионный насос для подачи лекарства с контролируемой скоростью; US 4486194, которое раскрывает терапевтическое приспособление для подачи лекарств через кожу; US 4447233, которое раскрывает медицинский инфузионный насос для доставки лекарства с точной скоростью инфузии; US 4447224, которое раскрывает имплантируемое устройство для инфузии с переменной скоростью для постоянной дос-

тавки лекарств; US 4439196, которое раскрывает осмотическую систему доставки лекарств, обладающую многокамерным отсеками; и US 4475196, которое раскрывает осмотическую систему доставки лекарств. Много других имплантов, систем доставки и модулей известны специалисту в данной области.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно составлять для особых путей введения, например для введения через рот, через нос, топикального (включая защекий, чрезкожный и подъязычный), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Фармацевтические композиции можно подходящим образом представлять в единицах формодозы и можно получать любым способом, известным в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения одной формодозы, варьирует в зависимости от объекта для излечения и данного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения одиночной формодозы, по существу, является тем количеством композиции, которое дает терапевтический эффект. По существу, вне 100% такое количество находится в интервале от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного ингредиента, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 70%, например от приблизительно 1 до приблизительно 30%.

Независимо от избранного пути применения соединения согласно настоящему изобретению, которые можно применять в форме фармацевтически приемлемой соли или в подходящей гидратированной форме и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению формулируют в фармацевтически приемлемые формодозы с помощью общепринятых способов известных специалисту в данной области. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет нужную биологическую активность родительского соединения и не вносит никаких нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977)). Примеры таких солей включают дополнительные соли кислот и оснований. Дополнительные соли кислот включают таковые, произведенные из нетоксичных неорганических кислот, например соляной, азотной, фосфорной, серной, бромистоводородной, йодистоводородной, фосфористой кислоты и т.п., а также нетоксичных органических кислот, например алифатических моно- и дикарбоновых кислот, фенилзамещенных алкановых кислот, гидроксиполарных кислот, ароматических кислот, алифатических и ароматических сульфоновых кислот и т.п. Дополнительные соли оснований включают таковые, произведенные из щелочных металлов, например натрия, калия, магния, кальция и т.п., а также нетоксичных органических аминов, например N,N'-дибензилэтилендиамина, N-метилглюкамина, хлорпрокаина, холина, диэтанолamina, этилендиамина, прокаина и т.п.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все подходящие растворители, диспергирующие среды, покрывающие, противобактериальные противогрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и агенты, замедляющие адсорбцию и т.п., которые физиологически совместимы с соединением согласно настоящему изобретению.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, физиологический раствор, физиологический раствор на фосфатном буфере, этанол, декстрозу, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, например оливковое масло, кукурузное масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, смолу трагаканта и органические эфиры для инъекций, например этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Кроме того и до тех пор пока общепринятая среда или агент не становится несовместимым с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях охватывается изобретением.

Нужную текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрывающих материалов, например лецитина, посредством поддержания нужного размера частиц в случае дисперсий и с помощью любого поверхностно-активного вещества.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут также включать приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, например аскорбиновую кислоту, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и т.п., (2) жирорастворимые антиоксиданты, например аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксипантол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (АНТ), лецитин, пропиленгаллат, α -токоферол и т.п., и (3) агенты хелаторы металлов, например лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, виннокаменная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут также включать агенты, придающие изотоничность, например сахара, многоатомные спирты, например маннит, сорбит, глицерин или хлористый натрий в композициях.

Фармацевтически приемлемые разжижители включают физиологический раствор и водные буферные растворы.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут также содержать одно или

более вспомогательное вещество, подходящее для избранного пути приема, например консерванты, увлажняющие агенты, эмульсифицирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут увеличивать время хранения или эффективность фармацевтических композиций. Соединения согласно настоящему изобретению можно, например, смешивать с лактозой, сахарозой, порошками (например, порошком крахмала), эфирами целлюлозы и алкановых кислот, стеариновой кислотой, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислот, аравийской камедью, желатином, алгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом. Другими примерами адъювантов являются QS21, GM-CSF, SRL-172, гистамин дигидрохлорид, тимокартин, тиотепа, композиции монофосфорил-липид A/микобактерии, квасцы, неполный адъювант Фрейнда (Freund's adjuvant), монтанид ISA, адъювантная система рибосом (ribi), адъювант TiterMax, адъювантные составы синтекс (syntex adjuvant formulations), иммуностимулирующие комплексы (ISCOMs), адъювант гербу (gerbu), ЦфГ (CpG) олигонуклеотиды, липополисахарид и полиинозиновая полицитидиновая кислота.

Предотвращение присутствия микроорганизмов можно обеспечить как с помощью процедур стерилизации, так и с помощью включения различных противобактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Дополнительно продолжительную абсорбцию фармацевтической форме для инъекции можно придать с помощью включения агентов, которые задерживают абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, включающие соединение согласно настоящему изобретению, могут также включать его подходящую соль. Любая подходящая соль, например, соль щелочного металла в любой подходящей форме (например, буферная соль) может применяться для стабилизации соединения согласно настоящему изобретению. Подходящие соли обычно включают хлорид натрия, сукцинат натрия, сульфат натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат магния и хлорид кальция. В одном варианте реализации применяют соль алюминия для стабилизации соединения согласно настоящему изобретению в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, где соль алюминия может также служить в качестве разбавителя, когда композицию назначают больному.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут существовать в разнообразных формах. Такие формы включают, например, жидкую, полутвердую и твердую лекарственные формы, например жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, эмульсии, микроэмульсии, гели, кремы, гранулы, порошки, таблетки, пилюли, порошки, липосомы, дендримеры и другие наночастицы (см., например, Baek et al., *Methods Enzymol.* 362, 240-9 (2003), Nigavekar et al., *Pharm Res.* 21(3), 476-83 (2004), микрочастицы и суппозитории.

Оптимальная форма зависит от избранного способа применения, природы композиции и терапевтического приложения. Рецептуры могут включать, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, липид-(катионный или анионный)содержащие пузырьки, ДНК конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли разных молекулярных весов), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любое из вышеперечисленных может подходить для лечения и терапии согласно настоящему изобретению, предоставляя активный ингредиент в фармацевтической композиции, который не является деактивированным рецептированием и рецептура является физиологически совместимой с путем введения. См., например, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J. Pharm. Sci Technol.* 52, 238-311 (1998) и цитаты в настоящей заявке для дополнительной информации, относящейся к вспомогательным веществам и носителям, известным химикам-фармацевтам.

Соединения согласно настоящему изобретению можно получать с носителями, которые будут защищать соединения от быстрого высвобождения, например рецептуры с контролируемым высвобождением, включая импланты, чрескожные накладки (пластыри) и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биodeградируемые биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полиглицолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота сами по себе или с воском или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы получения таких рецептур, по существу, известны специалисту в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Чтобы вводить композиции согласно настоящему изобретению посредством определенных путей введения, может быть необходимым покрывать соединение или вводить соединение совместно с материалом для предотвращения его инактивации. Например, соединение согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту вместе с подходящим носителем, например, в липосомах или растворителе. Липосомы включают вода-в-масле-в-воде CGF эмульсии, также как и общеизвестные липосомы (Strejan et al., *J. Neuroimmunol.* 7, 27 (1984)).

В зависимости от пути введения активное соединение можно покрывать материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение. Например, соединение можно вводить субъекту с подходящим носителем, например липосомами.

Липосомы включают вода-в масле-в-воде CGF эмульсии, также как и общеизвестные липосомы (Strejan et al., *J. Neuroimmunol.* 7, 27 (1984)).

В одном варианте реализации соединения согласно настоящему изобретению можно включать в рецептуры для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) исключает многие сильно гидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы терапевтические соединения согласно настоящему изобретению пересекали ГЭБ (при необходимости), их надо включать в рецептуры, например, с липосомами. Способы получения липосом см., например, в US 4522811, US 5374548 и US 5399331. Липосомы могут включать один или более компонент, который избирательно переносится в специфическую клетку или орган, что усиливает направленную доставку лекарства (см., например, V.V. Ranade *J. Clin. Pharmacol.* 29, 685 (1989)). Примеры направляющих компонентов включают фолат или биотин (см., например, US 5416016), маннозиды (Umezawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1038 (1988)), антитела (P.G. Bloeman et al., *FEBS Lett.* 357, 140 (1995), M. Owais et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 180 (1995)), поверхностный рецептор белка A (Briscoe et al., *Am. J. Physiol.* 1233, 134 (1995)), различные виды которых могут включать фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, а также соединения изобретенных молекул, p120 (Schreier et al., *J. Biol. Chem.* 269, 9090 (1994)), see also K. Keinänen, M.L. Laukkanen, *FEBS Lett.* 346, 123 (1994) and J.J. Killion, I.J. Fidler, *Immunomethods* 4, 273 (1994).

В одном варианте реализации настоящего изобретения соединения согласно настоящему изобретению включены в рецептуру с липосомами. В дополнительном варианте реализации липосомы включают нацеливающий компонент. В дополнительном варианте реализации соединения в липосомах доставляются с помощью болюсного вливания в участок, расположенный близко от нужной области, например участок воспаления или инфекции или участок опухоли. Композиция должна быть текучей в такой степени, чтобы с ней было легко управляться с помощью шприца. Она должна быть стабильной во время производства и хранения и должна быть предохранена от загрязняющего действия микроорганизмов, например бактерий и грибов.

В одном варианте реализации соединения согласно настоящему изобретению можно включать в рецептуру для уменьшения их переноса через плаценту. Это можно сделать с помощью способов, известных в данной области, например с помощью ПЭГилирования соединений или применения F(ab')₂ фрагментов. Далее можно сослаться на Cunningham-Rundles C. et al., *J. Immunol. Methods.* 152, 177-190 (1992) and to Landor M., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 74, 279-283 (1995).

Фармацевтически приемлемые носители для парентерального применения включают стерильные водные растворы или дисперсии или стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекции. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Кроме тех случаев, когда общепринятая среда или агент не совместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению охватывается изобретением. Дополнительные активные соединения также можно включать в композиции.

Фармацевтические композиции для инъекции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиции можно готовить в виде растворов, микроэмульсий, липосом и других организованных структур, подходящих для высокой концентрации лекарства. Носитель может быть водным или неводным растворителем или средой для дисперсии, содержащими, например, воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, например оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, например этилолеат. Нужную текучесть можно поддерживать, например, с помощью материалов покрытия, например лецитина, посредством поддержания нужного размера частиц в случае дисперсий и с помощью любого поверхностно-активного вещества. Во многих случаях предпочтительно включать в композиции изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, например глицерин, маннит, сорбит или хлористый натрий. Продленную абсорбцию фармацевтической форме для инъекции можно придать с помощью включения агентов, которые задерживают абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные растворы для инъекций можно получать посредством включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией составляющих, например, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией посредством микрофильтрации. По существу, дисперсии получают с помощью включения соединения в стерильное средство, содержащее основную среду для дисперсии и другие требуемые ингредиенты, например, из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для получения стерильного раствора для инъекций примерами способов получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, что приводит к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент из его предварительно стерилизованных с помощью стерильного фильтрования раствора.

Стерильные растворы для инъекций можно получать посредством включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией составляющих, например, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией посредством микрофильтрации. По существу, дисперсии получают с помощью включения соединения в стерильное сред-

во, содержащее основную среду для дисперсии и другие требуемые ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для получения стерильного раствора для инъекций примерами способов получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, что приводит к получению порошка активного ингредиента плюс дополнительный нужный ингредиент из его предварительно стерилизованных с помощью стерильного фильтрования раствора.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать одно соединение согласно настоящему изобретению или комбинацию соединений согласно настоящему изобретению. Так, в одном варианте реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению включает комбинацию нескольких (например, двух или более) соединений согласно настоящему изобретению, действующих по различным механизмам, например одно соединение, которое, по существу, действует посредством включения CDC, в комбинации с другим соединением, которое, по существу, действует посредством включения апоптоза.

CD38BP (включая анти-CD38 антитела, иммуноконъюгаты, биспецифичные/мультиспецифичные молекулы, композиции и другие производные, описанные в настоящей заявке) согласно настоящему изобретению имеют многочисленные *in vitro* и *in vivo* диагностические и терапевтические приложения, включающие диагностику и лечение нарушений, включающих клетки, экспрессирующие CD38. Например, антитела можно давать клеткам в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*, или субъекта людям, например, *in vivo* для лечения, предотвращения и диагностики разнообразных нарушений. Как применяется в настоящей заявке, термин "субъект" включает людей и животных, отличных от человека, которые отвечают на CD38BP. Субъекты могут, например, включать больных людей с нарушениями, которые можно корректировать или устранить посредством ингибирования функции CD38, например ферментативной активности, передачи сигнала, индукции экспрессии цитокинов, индукции пролиферации или дифференциации и/или индукции лизиса и/или уничтожения/уменьшения числа экспрессирующих CD38 клеток.

Например, CD38BP можно применять для проявления *in vivo* или *in vitro* одной или более из следующих биологических активностей: ингибирования функции CD38, (например, ферментативной активности, передачи сигнала, индукции экспрессии цитокинов, индукции пролиферации или дифференциации и/или индукции лизиса), уничтожения экспрессирующих CD38 клеток, опосредования фагоцитоза или ADCC продуцирующих CD38 клеток в присутствии эффекторных клеток человека и с помощью опосредования CDC экспрессирующих CD38 клеток в присутствии комплемента или с помощью уничтожения экспрессирующих CD38 клеток посредством апоптоза.

Любая композиция, включающая CD38BP антитела согласно настоящему изобретению, обладающие участками связывания комплемента, например частями IgG1, -2 или -3 или IgM, которые связывают комплемент, может также применяться в присутствии комплемента. В одном варианте реализации обработку *ex vivo* популяции клеток, включающей клетки мишени CD38BP согласно настоящему изобретению и подходящие эффекторные клетки можно дополнять посредством добавления комплемента или сыворотки, содержащей комплемент. Фагоцитоз или лизис клеток мишени, покрытых CD38BP согласно настоящему изобретению можно улучшить посредством связывания белков комплемента. В одном варианте реализации клетки мишени, покрытые CD38BP согласно настоящему изобретению, могут также лизироваться комплементом. В одном варианте реализации клетки, покрытые CD38BP согласно настоящему изобретению, не активируют комплемент.

CD38BP согласно настоящему изобретению можно также применять совместно с комплементом. Соответственно, настоящее изобретение охватывает композиции, включающие CD38BP с сывороткой или комплементом. В таких композициях комплемент находится в тесной близости от CD38BP, например, за счет конъюгации или может подбираться для одновременного применения. Альтернативно, CD38BP и сыворотку или комплемент можно применять по отдельности.

CD38BP согласно настоящему изобретению также можно применять для нацеливания на экспрессирующие FcγR или CD38 клетки, например, чтобы пометить такие клетки. Для такого применения CD38BP может быть связан с молекулой, которую можно детектировать. Так, настоящее изобретение обеспечивает способы локализации *in vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc рецепторы, например, FcγR или CD38. Детектируемыми метками могут быть, например, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента.

Специфичные для мишени эффекторные клетки, например, эффекторные клетки, связанные с CD38BP согласно настоящему изобретению, можно также применять в качестве терапевтических агентов. Эффекторные клетки для нацеливания могут быть лейкоцитами человека, такими как макрофаги, нейтрофилы или моноциты. Другие клетки включают эозинофилы, природные клетки-убийцы и другие клетки, несущие IgG- или IgA рецепторы. Если требуется, эффекторные клетки можно получать у субъекта на лечении. Эффекторные клетки, специфичные для мишени, можно давать в виде суспензии клеток в физиологически приемлемом растворе. Число назначаемых клеток может быть порядка от 10^8 до 10^9 , но варьирует в зависимости от терапевтической цели. По существу, количество должно быть достаточным для получения локализации на клетке мишени, например раковой клетке, экспрессирующей CD38, и

для эффективного уничтожения клетки, например, за счет фагоцитоза или лизиса.

Терапия специфичными для мишени эффекторными клетками может проводиться в сочетании с другими техниками для удаления клеток мишени. Например, противораковую терапию с применением CD38BP согласно настоящему изобретению и/или эффекторных клеток, вооруженных такими композициями, можно применять в сочетании с химиотерапией. Дополнительно комбинаторную иммунотерапию можно применять для направления двух различных цитотоксичных эффекторных популяций на отторжение опухолевой клетки. Например, CD38BP, связанный с анти-FcγR или анти-CD38, можно применять в сочетании с агентами, специфически связывающими IgG- или IgA рецепторы. Биспецифичные и мультиспецифичные молекулы по настоящему изобретению также можно применять для модуляции уровней FcαR или FcγR на эффекторных клетках, например, посредством покрытия и уничтожения рецепторов на поверхности клетки. Смеси анти-Fc рецепторов можно также применять для этой цели.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способы детектирования присутствия CD38 антигена в образце или измерения количества CD38 антигена, включающие контактирование образца и контрольного образца с CD38BP, который специфически связывается с CD38, в условиях, позволяющих образование комплекса между CD38BP или его частью и CD38. Образование комплекса далее детектируют, причем разница в образовании комплекса между образцом и контрольным образцом является указателем на присутствие CD38-антигена в образце. Примеры способов для детектирования при иммуноанализе включают без ограничения этим ELISA, RIA, FACS анализ, анализ с помощью плазмонного резонанса, хроматографический анализ, иммуногистохимию тканей, блоттинг (Western blot) и/или иммунопреципитацию.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно применять для детектирования уровней циркулирующего CD38 или уровней клеток, содержащих CD38 на поверхности своей мембраны, где эти уровни могут затем быть связаны с симптомами определенных заболеваний. Альтернативно, CD38BP можно применять для истощения или взаимодействия с функцией экспрессирующих CD38 клеток, таким образом определяя эти клетки как важные посредники заболевания. Этого можно достигнуть посредством контактирования образца и контрольного образца анти-CD38 антителом в условиях, позволяющих образование комплекса между антителом и CD38B, детекции и сравнения контроля и образца.

CD38BP согласно настоящему изобретению можно исходно тестировать на присутствие активности связывания для терапевтического или диагностического применения *in vitro*. Например, CD38BP можно тестировать с помощью проточной цитометрии. Далее можно анализировать активность CD38BP в запуске по меньшей мере одной опосредованной эффектором активности эффекторной клетки. Например, можно анализировать способность анти-CD38 антител согласно настоящему изобретению запускать CDC и/или апоптоз. Протоколы для анализа CDC, гомотипической адгезии, образования молекулярных кластеров или апоптоза хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ детектирования присутствия или количественной оценки экспрессирующих CD38 клеток *in vivo* или *in vitro*. Способ включает (1) дачу субъекту CD38BP согласно настоящему изобретению, конъюгированного с детектируемым маркером, (2) обследование субъекта подходящим способом для детекции упомянутого детектируемого маркера для идентификации зон, содержащих экспрессирующие CD38 клетки.

В одном варианте реализации иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению можно применять для нацеливания соединений (например, терапевтических агентов, меток, цитотоксинов, иммуносупрессантов и т.д.) на клетки, имеющие на своей поверхности CD38, с применением таких нацеливающих соединений, как терапевтические соединения в иммуноконъюгатах согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации настоящее изобретение также предоставляет способы локализации *ex vivo* или *in vitro* экспрессирующих CD38 клеток (например, с помощью детектируемой метки, например радиоизотопа, флуоресцентного соединения, фермента или кофактора фермента).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способы уничтожения клеток, имеющих CD38, связанный с поверхностью, с помощью введения иммунотоксинов согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или предотвращения нарушений, включающих экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически активного количества CD38BP согласно настоящему изобретению субъекту, который в этом нуждается. Такие CD38BP применяют для ингибирования индуцированных CD38 активностей, связанных с некоторыми нарушениями, чтобы уничтожить или уменьшить число экспрессирующих CD38 клеток.

Такой способ включает введение субъекту композиции CD38BP согласно настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения или предотвращения нарушения. CD38BP композицию можно вводить саму по себе или с другим терапевтическим агентом, например, как описано в настоящей заявке в другом месте, который действует в сочетании или синергистически с CD38BP композицией для лечения или предотвращения нарушения, вовлекающего экспрессирующие CD38 клетки. Альтернативно, можно применять иммуноконъюгаты для уничтожения клеток, имеющих на своей поверхности экс-

прессированный CD38, посредством нацеливания цитотоксинов или радитоксинов на CD38.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нарушение, включающее экспрессирующие CD38 клетки, может быть опухолевым нарушением, например, нарушением, характеризуемым присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, например, лимфомой В-клеток, злокачественным перерождением плазматических клеток, лимфомой Т/НК-клеток и миелоидными злокачественными нарушениями.

Примеры таких опухолевых заболеваний включают лимфому/лейкозы В-клеток, включая лимфобластический лейкоз/лимфому предшественника В-клеток и неходжкинской лимфомы В-клеток, острый промиелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и неоплазмы зрелых В-клеток, например хронический лимфоцитарный лейкоз В-клеток/малая лимфоцитарная лимфома, острый лимфоцитарный лейкоз В-клеток, пролимфоцитарный лейкоз В-клеток, лимфопластическая лимфома, лимфома клеток мантии, фолликулярная лимфома, включая низкую степень, промежуточную степень и высокую степень, лимфома кожных фолликулярных центров, лимфома В-клеток маргинальной зоны (MALT типа, узлового и селезеночного типа), лейкоз ворсистых клеток, диффузная лимфома больших В-клеток, лимфома Беркитта, плазмацитома, миелома плазматических клеток, лейкоз плазматических клеток, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, макроглобулинемия Вальденстрема, лейкоз плазматических клеток и анапластическая лимфома больших клеток.

В одном варианте реализации нарушение, включающее экспрессирующие CD38 клетки, является множественной миеломой.

Примерами неходжкинских лимфом В-клеток являются лимфоматоидный лимфогранулематоз, первичная эффузионная лимфома, интраваскулярная лимфома больших В-клеток, медиастинальная лимфома больших В-клеток, заболевание тяжелых цепей (включая γ , μ и α -заболевания), лимфомы, индуцированные терапией иммуносупрессивными агентами, например лимфома, индуцированная циклоспорином и лимфома, индуцированная метотрексатом.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нарушение, включающее экспрессирующие CD38 клетки, может быть лимфомой Ходжкина.

Примерами нарушений, включающих экспрессирующие CD38 клетки, могут быть злокачественные перерождения, произошедшие из Т- и НК-клеток, включая неоплазмы зрелых Т-клеток и НК-клеток, включая пролимфоцитарный лейкоз Т-клеток, большой гранулярный лимфоцитарный лейкоз больших Т-клеток, агрессивный лейкоз НК-клеток, лейкоз/лимфома Т-клеток взрослых, лимфома внеузловых НК/Т-клеток, лимфома Т-клеток назального типа, энтеропатического типа, лимфома печеночно-селезеночных Т-клеток, подкожная панникулитоподобная лимфома Т-клеток, бластическая лимфома НК-клеток, фунгоидный микоз/синдром Сезари, лимфопролиферативное нарушение первичных кожных CD30 положительных Т-клеток (первичная кожная анапластическая лимфома больших клеток С-ALCL, лимфоматоидный папулез, граничные повреждения), ангиоиммунобластическая лимфома Т-клеток, неспецифическая лимфома периферических Т-клеток и анапластическая лимфома больших клеток.

Примеры злокачественных заболеваний, произошедших из миелоидных клеток, включают острый миелоидный лейкоз, включая острый промиелоцитарный лейкоз и хронические миелоэритроидные заболевания, включая хронический миелоидный лейкоз.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нарушение, включающее экспрессирующие CD38 клетки, может быть иммунным нарушением, связанным с экспрессирующими CD38 В-клетками, моноцитами и Т-клетками.

Примеры иммунных нарушений, связанных с экспрессирующими CD38 В-клетками, моноцитами и Т-клетками, включают аутоиммунные нарушения, например псориаз, псориатический артрит, дерматиты, системную склеродерму и склероз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, синдром респираторного заболевания, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, дефицит адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, ювенильный начинающийся диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунный сложный нефрит, IgA нефропатию, IgM полинейропатию, иммуно-опосредованную тромбоцитопению, например, острую идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру и хроническую идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гемолитическую анемию, миастению беременных, волчанку почки, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, атопический дерматит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, гранулематоз Вегенера, синдром Оменна, хроническую почечную недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, рассеянный склероз, HIV и заболевания, связанные с вирусом герпеса. Далее примерами являются синдром тяжелого острого дыхательного затруднения и хореоретинит. Далее включены другие заболевания и нарушения, например такие, которые обусловлены или опосредованы инфекцией В-клеток вирусом, например вирусом Эпштейн-Барра.

В одном варианте реализации нарушение, вовлекающее экспрессирующие CD38 клетки, является ревматоидным артритом.

Другие примеры воспалительных, иммунных и/или аутоиммунных нарушений, при которых аутоантитела и/или чрезмерная активность В- и Т-лимфоцитов являются значительными и которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают следующие:

васкулиты и другие заболевания сосудов, например микроскопический полиангиит, синдром Чарг-Штрауса и другие ANCA-связанные васкулиты, полиартрит узловатый, основной криоглобулинемический васкулит, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Кавазаки, артерит Такаясу, артерит гигантских клеток, пурпура Енош-Шенлейна, первичный или выделенный церебральный ангиит, эритема узловатая, облитерирующий тромбангиит, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (включая гемолитический уремический синдром) и вторичные васкулиты, включая кожный лейкоцитокластический васкулит (например, вторичный при гепатите В, гепатите С, макроглобулинемии Вальденстрема, неоплазиях В-клеток, ревматоидном артрит, синдроме Шегрена или системной красной волчанке); далее примерами являются эритема узловатая, аллергический васкулит, панникулит, болезнь Вебер-Кристиана, гиперглобулинемическая пурпура и болезнь Бергера;

кожные нарушения, например контактные дерматиты, дерматоз линейного IgA, витилиго, пиодерма гангренозная, приобретенный буллезный эпидермолиз (*epidermolysis bullosa acquisita*), обыкновенная пузырчатка (включая рубцовый пемфигиоид (*cicatricial pemphigoid*) и буллезный пемфигиоид (*bullous pemphigoid*)), круговая алопеция (включая общую плешивость (*alopecia universalis*) и полную плешивость (*alopecia totalis*)), герпесовидный дерматит (*dermatitis herpetiformis*), полиморфная эритема и хроническая аутоиммунная крапивница (включая ангионевротическую отечность и связанный с крапивницей васкулит (*urticarial vasculitis*));

Иммуноопосредованные цитопении, например аутоиммунная нейтропения и чистая аплазия эритроцитов;

нарушения соединительной ткани, например CNS волчанка, дискоидная красная волчанка, CREST синдром, смешанное заболевание соединительной ткани, полимиозит/дерматомиозит, миозит телец включения, вторичный амилоидоз, криоглобулинемия типа I и типа II, фибромиалгия, синдром фосфолипидных антител, вторичная гемофилия, возвратный полихондрит, саркоидоз, синдром скованного человека и ревматическая лихорадка; далее примером является эозинофильный фасцилит;

артриты, например анкилоидный спондилит, ювенильный хронический артрит, болезнь Стилла взрослых и синдром SAPHO; далее примерами являются сарколит, реактивный артрит, болезнь Стилла и подагра;

гематологические нарушения, например апластическая анемия, первичная гемолитическая анемия (включая синдром холодного агглютинина), гемолитическая анемия, вторичная для CLL или системной красной волчанки, синдром POEMS, пернициозная анемия и гиперглобулинемическая пурпура Вальденстрема; далее примеры включают агранулоцитоз, аутоиммунную нейтропению, болезнь Франклина, болезнь Селигмана, болезнь гамма тяжелой цепи, паранейропластический синдром вторичный для тимомы и лимфом, паранейропластический синдром, вторичный для тимомы и лимфом, и образование ингибитора фактора VIII;

эндокринопатии, например полиэндокринопатия и болезнь Адисона, далее примерами являются аутоиммунная гипогликемия, аутоиммунный гипотиреозит, аутоиммунный инсулиновый синдром, тиреоидит де-Кервена и опосредованная антителом к рецептору инсулина устойчивость к инсулину;

гепато-гастроинтестинальные нарушения, например заболевание целиак, болезнь Виппла, первичный желчный цирроз, хронический активный гепатит и первичный склеротический холангит, дальнейшим примером является аутоиммунный гастрит;

нефропатии, например быстрый прогрессирующий гломерулонефрит, постстрептококковый нефрит, синдром Goodpasture, мембранный гломерулонефрит и криоглобулинемический нефрит, далее примером является болезнь минимального изменения;

нейрологические нарушения, например аутоиммунные нейропатии, *mononeuritis multiplex*, миастенический синдром Ламберта-Итона, хорей Сиденхама, *tabes dorsalis* и синдром Гийена-Барре, далее примерами являются миелопатический /тропикальный спастический парализ, миастения беременных, острая воспалительная демиелинирующая полинейропатия и хроническая воспалительная демиелинирующая полинейропатия, рассеянный склероз;

сердечные и легочные нарушения, например COPD, фиброзный альвеолит, облитерирующий бронхиолит, аллергический аспергиллоз, фиброзный цистит, синдром Леффлера, миокардит и перикардит, далее примерами являются гиперсенситивная пневмония и паранеопластический синдром вторичный для рака легких;

аллергические нарушения, например бронхиальная астма, гипер-IgE синдром, далее пример включает *amaurosis fugax*;

офтальмологические заболевания, например идиопатический хориоретинит;

инфекционные заболевания, например инфекция парвовирусом В (включая синдром рук-и-носов);

гинекологические-родовспомогательные нарушения, например рецидивный аборт, рецидивная потеря плода, и внутриматочное замедление роста, далее примером является паранеопластический синдром, вторичный для гинекологических неоплазм;

нарушения мужской репродуктивной системы, например паранеопластический синдром, вторичный для неоплазмы яичка и

нарушения, возникающие при трансплантации, например отторжение аллотрансплантата или ксе-

нотрансплантата и болезнь трансплантат-против-хозяина.

Антитело можно также назначать профилактически, чтобы уменьшить риск развития рака, например, при опухолеговом нарушении, как описано выше, задержать наступление события при таком развитии рака и/или уменьшить риск рецидива во время ремиссии рака. Это может быть особенно полезным для больных, когда трудно локализовать опухоль, о присутствии которой известно благодаря другим биологическим факторам.

Композиции согласно настоящему изобретению могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" CD38BP. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству эффективному при необходимых дозировках и периоде времени применения для достижения терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество CD38BP может варьировать в соответствии с такими факторами, как стадия болезни, возраст, пол и вес индивидуума и способность CD38BP проявлять нужный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество является также таким, в котором любые токсические или вредные воздействия антитела или частей антитела перевешиваются терапевтическими благотворными воздействиями. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в нужных дозировках и периоде времени применения для достижения желаемого профилактического результата (например, уменьшение вероятности развития нарушения, уменьшения интенсивности или распространения нарушения, увеличения вероятности выживания при угрозе нарушения, задержка наступления болезненного состояния и т.д.). Обычно, поскольку профилактическая доза применяется у субъектов до или на ранней стадии болезни, профилактически эффективное количество будет ниже терапевтически эффективного количества.

"Терапевтически эффективное количество" для опухолевой терапии можно также измерять по их способности стабилизировать развитие болезни. Способность соединения ингибировать рак можно оценить в животной модельной системе, дающей прогноз эффективности для опухолей человека. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить посредством исследования способности соединения ингибировать рост клеток или индуцировать апоптоз с помощью анализа *in vitro*, известного квалифицированному практическому специалисту. Терапевтически эффективное количество или терапевтическое соединение может уменьшить размер опухоли или каким-либо другим способом облегчить симптомы заболевания у субъекта. Специалист в данной области сможет определить такое количество, основываясь на таких факторах, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и данная композиция или выбранный способ применения.

"Терапевтически эффективное количество" при ревматоидном артрите может приводить, по меньшей мере, к ACR₂₀ предварительного определения улучшения (Preliminary Definition of Improvement) у больных, например, по меньшей мере, к ACR₅₀ предварительного определения улучшения, например, по меньшей мере, к ACR₇₀ предварительного определения улучшения.

ACR₂₀ предварительного определения улучшения определяют как

≥20% улучшения в числе мягких суставов Tender Joint Count (TJC) и числе опухших суставов Swollen Joint Count (SJC)

и ≥20% улучшения в трех из следующих 5 оценок: оценка боли больным (VAS)₁, общая оценка больным (VAS), общая оценка терапевтом (VAS), неспособность больного по его самооценке (HAQ), реактант острой фазы (CRP или ESR).

ACR₅₀ и ACR₇₀ определяются тем же способом с улучшениями ≥50% и ≥70% соответственно. Более детально см. Felton et al., in American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; *Arthritis Rheumatism* 38, 727-735 (1995).

Альтернативно, терапевтически эффективное количество для ревматоидного артрита можно измерять с помощью DAS (счет активности болезни), включая DAS28 и/или DAS56, как определено EULAR.

Режимы дозировки подбирают так, чтобы предоставить оптимальный нужный ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно назначать единственное болюсное вливание, можно назначать несколько разделенных доз в течение времени или дозу можно пропорционально уменьшить или увеличивать по показаниям терапевтической ситуации. Парентеральные композиции можно включать в единицы лекарственной формы для простоты применения и единообразия дозировки. Единица лекарственной формы, как применяется в настоящей заявке, относится обычно к отдельным физическим единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов на лечении; каждая единица содержит количество активного соединения, рассчитанное для получения нужного терапевтического воздействия в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация единиц лекарственной формы согласно настоящему изобретению продиктована и прямо зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и данного терапевтического эффекта, который требуется достигнуть, и (б) ограничений, присущих данной области техники для расчета количеств такого активного соединения для лечения с учетом чувствительности индивидуумов.

Эффективные дозировки и схемы введения дозировок для CD38BP согласно настоящему изобретению зависят от заболевания или состояния, которое надо лечить, и могут быть определены специалистом в данной области. Например, неограничивающий интервал для терапевтически эффективного количества

соединения согласно настоящему изобретению составляет приблизительно 0,1-100 мг/кг, например приблизительно 0,1-50 мг/кг, например приблизительно 0,1-20 мг/кг, например приблизительно 0,1-10 мг/кг, например приблизительно 0,5, например приблизительно 0,3, приблизительно 1 или приблизительно 3 мг/кг.

Терапевт или ветеринар, являющиеся обычными специалистами в данной области, легко определяют и пропишут эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, терапевт или ветеринар могут начать с доз CD38BP согласно настоящему изобретению, включенных в фармацевтические композиции на уровнях ниже необходимых для достижения нужного терапевтического действия и постепенно увеличивать дозировку, пока не будет достигнуто нужное действие. По существу, подходящей ежедневной дозой композиции согласно настоящему изобретению станет такое количество соединения, которое является наинизшей дозой, эффективной для оказания терапевтического воздействия. Такая эффективная доза, по существу, будет зависеть от вышеописанных факторов. Применение может быть внутривенным, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным или подкожным и, например, назначаться по близости от участка мишени. При необходимости, эффективную ежедневную дозу фармацевтической композиции можно давать как две, три, четыре, пять, шесть или более поддоз, назначаемых по отдельности через нужные интервалы времени в течение дня при необходимости в единицах формодозы. Хотя для соединения согласно настоящему изобретению возможно назначение его одного, предпочтительно назначать соединение в виде фармацевтической композиции, как описано выше.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать посредством инфузии при еженедельной дозировке от 10 до 500 мг/м², например от 200 до 400 мг/м². Такое применение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например 3-5 раз. Применять можно посредством непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать посредством медленной инфузии в течение долгого периода времени, например более 24 ч, чтобы уменьшить токсические побочные эффекты.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать при еженедельной дозировке от 250 до 2000 мг, например 300 мг, 500 мг, 700 мг, 1000 мг, 1500 мг или 2000 мг до 8 раз, например от 4 до 6 раз. Применять можно посредством непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. Такой режим можно повторять один или более раз, при необходимости, через 6 месяцев или 12 месяцев. Дозировку можно определять посредством измерения количества соединения согласно настоящему изобретению в крови при проведении лечения с помощью, например, забора биологических образцов и применения антиидиотипических антител, которые нацелены на участок связывания антигена CD38BP согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать посредством поддерживающей терапии, например, раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать по схеме, включающей одну инфузию CD38BP согласно настоящему изобретению с последующей инфузией CD38BP согласно настоящему изобретению, конъюгированного с радиоизотопом. Схему можно повторять, например, на 7-9 дней позже.

В качестве нелимитирующих примеров лечение согласно настоящему изобретению можно проводить в виде ежедневной дозировки соединения согласно настоящему изобретению в количестве приблизительно 0,1-100 мг/кг, например 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в день, по меньшей мере через один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или альтернативно, по меньшей мере через 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 любой их комбинации, применяя одиночную или разделенные дозы каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч или любую их комбинацию.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно также назначать в комбинационной терапии, например в комбинации с другими терапевтическими агентами, относящимися к заболеванию или состоянию, которое следует лечить. Такие введения могут быть одновременными, раздельными или последовательными. Для одновременного введения агенты можно давать в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, как требуется.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения нарушения, вовлекающего экспрессирующие CD38 клетки, как описано выше, причем способы включают введение CD38BP согласно настоящему изобретению в комбинации с одним или более терапевтическим агентом, как описано выше.

Настоящее изобретение также предоставляет применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом при нарушении, вовлекающем экспрессирующие CD38 клетки, как описано выше.

В одном варианте реализации комбинированная терапия может включать введение композиции согласно настоящему изобретению вместе по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом, по

меньшей мере одним противовоспалительным агентом или по меньшей мере одним иммуносупрессивным и/или иммуномодуляторным агентом.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, вовлекающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента субъекту, который в них нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента субъекту, который в них нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из антиметаболитов, таких как метотриксат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанидин, цитарабин, флюдарабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладротибин и сходные агенты.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из алкилирующих агентов, таких как мехлоретамин, тиоепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSMU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоксин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, например карбоплатин и сходные агенты.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из антибиотиков, таких как дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубин (ранее дауномицин), доксорубин, идарубин, митрамицин, калихеамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC) и сходные агенты.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из противомитотических агентов, таких как таксаны, например доцетаксель и паклитаксель и алкалоидов вьюнка, например виндезин, винкристин, винбластин и винорелбин.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из ингибитора топоизомеразы, такого как топотекан.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент можно выбрать из ингибиторов фактора роста, таких как ErbB1 (EGFR) (например, гефитиниб (Iressa®), цетуксимаб (Erbix®), эрлотиниб (Tarceva®), HuMax-EGFr (2F8 раскрытый в WO 2002/100348) и сходные агенты), ингибитор ErbB2 (Her2/neu) (например, трастузумаб (Herceptin®) и сходные агенты) и сходные агенты. В одном варианте реализации такой ингибитор фактора роста может быть ингибитором фанезил-трансферазы, например SCH-66336 и R115777. В одном варианте реализации такой ингибитор фактора роста может быть ингибитором фактора роста эндотелия (VEGF), например бевасизумаб (Avastin®).

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент может быть ингибитором тирозинкиназы, например иматиниб (Glivec, Gleevec STI571), лапатиниб, PTK787/ZK222584 и сходные агенты.

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент может быть ингибитором гистон-деацетилазы. Примеры таких ингибиторов гистон-деацетилазы включают основанные на гидроксамовой кислоте гибридные полярные соединения, например SANA (субероиланилидгидроксамовой кислоты).

В одном варианте реализации такой химиотерапевтический агент может быть ингибитором P38 MAP киназы, например SCIO-469.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способы лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации у субъекта, который в этом нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способы лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации у субъекта, который в этом нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения по меньшей мере с одним ингибитором ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации для лечения множественной миеломы.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы, ингибиторы металлопротеазы матрикса (например, маримастат, неовастат, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 и сходные агенты), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальной клетки (например, TNP-470, скваламин, 2-метоксистеррадиол, комбретастатин, эндостатин, ангиостатин, пенициламин, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) и сходные агенты), антагонисты ангиогенных факторов роста (например, ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных агентов и

их рецепторов (например, VEGF, bFGF и ангиопоэтин-1) талидомид (Thalomid®), аналоги талидомида (например, CC-5013 (леналидомид, Revlimid™)) и CC4047 (Actimid™), Sugen 5416, SU5402, противоангиогенный рибозим (например, ангиозим), интерферон α (например, интерферон $\alpha 2a$), сурамин и сходные агенты), VEGF-R ингибиторы киназы и другие противоангиогенные ингибиторы тирозинкиназы (например, SU011248), ингибиторы эндотелий-специфичного сигнала интегрин/выживания (например, витаксин и сходные агенты), хелаторы антагонисты меди (например, тетратиомолибдат, каптонрил и сходные агенты), карбоксиамидотриазол (CAI), ABT-627, CM101, интерлейкин-12, (IL-12), IM862, PNU145156E, а также молекулы нуклеотидов, ингибирующие ангиогенез (например, противосмысловая-VEGF кДНК, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая p53, и кДНК, кодирующая дефицитный рецептор-2) и сходные агенты.

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации являются противоангиогенные производные гепарина и родственные молекулы (например, гепариназа III), темолозомид, NK4, фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), ингибиторы циклооксигеназы 2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1, против оангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагиллин и его аналоги, аналоги соматостатина, пентозан полисульфат, текогалан натрия, далтепарин, тумстаин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других близких мишеней (например, анти- α -v/ β -3 интегрин и антикининостаин mAbs) и сходные агенты.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения с талидомидом (Thalomid®), аналогами талидомида (например, CC-5013 (леналидомид, Revlimid™) и/или CC4047 (Actimid™)). В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения с талидомидом.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения с анти-CD20 антителом, например ритуксимаб (Rituxan®, Mabthera®) моноклональное анти-CD20 антитело, как раскрыто в WO 2004/035607, например, 11B8, 2F2 или 7D8.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть ингибитором протеасомы, например бортазомибом (Velcade®).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть кортикостероидом, например преднизолоном, преднизолоном, дексаметазоном и т.п.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть противораковым иммуногеном, например антиген рака/связанный с опухолью антиген (например, молекула адгезии эпителиальной клетки (EPCAM/TACSTD1), муцин 1 (MUC1), карциноэмбриональный антиген (CEA), связанный с опухолью гликопротеин 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, связанные с раком вирусные вакцины (например, вакцины папилломавируса человека) произведенные из опухолей белки теплового шока и сходные агенты. Большое число других подходящих раковых антигенов/связанных с опухолью антигенов, описанных в настоящей заявке, и сходных молекул, известных в данной области, можно также или альтернативно применять в таком варианте. Противораковые иммуногенные пептиды также включают противоидиотипические вакцины, например BEC2 антиидиотипические антитела, митумомаб (Mitumomab), CeaVac и родственные антиидиотипические антитела, антиидиотипическое антитело к MG7 антителу и другие противораковые антиидиотипические антитела (см., например, Birebent et al., Vaccine. 21 (15), 1601-12 (2003), Li et al., Chin. Med. J. (Engl). 114(9), 962-6 (2001), Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96 (1994), Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209 (1985), Raychardhuri et al., J. Immunol. 137(5), 1743-9 (1986), Pohl et al., Int. J. Cancer. 50(6), 958-67 (1992), Bohlen et al., Cytokines Mol. Ther. 2(4), 231-8 (1996) и Maruyama, J. Immunol. Methods. 264(1-2). 121-33 (2002)). Такие антиидиотипические Abs можно при необходимости конъюгировать с носителем, который может быть синтетической (обычно инертной) молекулой носителя, белком (например, гемоцианин моллюска (keyhole limpet) (KLH) (см., например, Ochi et al., Eur. J. Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)), или клеткой (например, эритроцитом, см., например, Wi et al., J. Immunol. Methods. 122(2), 227-34 (1989)).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть бисфосфонатом. Примерами потенциально пригодных бисфосфонатов являются памидронат (Aredia®), золедроновая кислота (Zometa®), клодронат (Bonefos®), ризендронат (Actonel®), ибандронат (Boniva®), этидронат (Didronel®), алендронат (Fosamax®), титлудронат (Skelid®), инкадронат (Yamanouchi Pharmaceutical) и минодронат (YM529, Yamanouchi).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть фактором сти-

муляции колоний. Примерами пригодных факторов стимуляции колоний могут быть факторы стимуляции колоний гранулоцитов (G-CSF), например филграстим (Neupogen®) пегфилграстим (Neulasta®), и факторы стимуляции колоний макрофагов (GM-CSF), например саграмостин (Leukine®).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть эритропоэтический агент. Примерами пригодных эритропоэтических агентов являются эритропоэтин (EPO), например эпоэтин α (например, Procrit®, Erogen® и Eprex®) и эпоэтин β (например, NeoRecormon®) и белки, стимулирующие эритропоэз (например, Aranesp®).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть противораковый цитокин, хемокин или их сочетание. Примерами пригодных цитокинов являются факторы роста, включая IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (например, INF α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, FltS лиганд, фактор стволовых клеток, анцестим и TNF α . Подходящими хемокинами могут быть Глу-Лей-Арг (ELR)-отрицательные хемокины, например, IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1 α из семейства CXC и C-C хемокинов человека. Подходящие цитокины включают производные цитокина, варианты цитокина, фрагменты цитокина и составные белки с цитокином.

Эти и другие способы и применения, включающие нуклеиновые кислоты, кодирующие встречающиеся в природе пептиды, в настоящей заявке можно альтернативно или дополнительно осуществлять с помощью "генной активации" и техник повышающего регулирования гомологичных рекомбинантных генов, например, как описано в US 5968502, US 6063630 и US 6187305 и EP 0505500.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть агентом, который модулирует, например, усиливает или ингибирует экспрессию или активность Fc α или Fc γ рецепторов. Примеры подходящих для такого применения агентов включают интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), фактор стимуляции колоний гранулоцитов (G-CSF), например филграстим (Neupogen®) и пегфилграстим (Neulasta®), факторы стимуляции колоний гранулоцитов макрофагов (GM-CSF) например сарграмостин (Leukine®), интерферон- γ (IFN γ) и фактор некроза опухолей (TNF).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть регулятором контроля клеточного цикла/апоптоза (или "регулирующим агентом"). Регулятор контроля клеточного цикла/апоптоза может включать молекулы (1) которые направляют и модулируют регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза, например cdc-25 (например, NSC 663284), (2) циклинзависимые киназы, которые сверхстимулируют клеточный цикл (например, флавопиридол (L868275, HMR1275), 7-гидрокситауроспорин (UCN-01, KW-2401) и росковитин (R-росковитин, CYC202)), и (3) модуляторы теломераз (например, B1BR1532, SOT-095, GRN163 и композиции, описанные, например, в US 6440735 и US 6713055). Нелимитирующие примеры молекул, которые взаимодействуют с путями апоптоза, включают TNF-связанный индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL)/апоптоз-2 лиганд (Apo-2L), агенты, индуцирующие NF- κ B блокаду, приводящую к ингибированию продукции IL-6, антитела, активирующие TRAIL рецепторы, IFN γ 1, противосмысловые Bcl-2 и As $_2$ O $_3$ (триоксид мышьяка, Trisenox®).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть гормональным регулирующим агентом, например агентами, применимыми в противоандрогенной и противоэстрогенной терапии. Примерами таких гормональных регулирующих агентов являются тамоксифен, идоксифен, фулверстрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстильбестрол, этинилэстрадиол/этинил, антиандроген (например, флутамид/эулексин), прогестин (например, гидроксипрогестерон капроат, медроксипрогестерон/ровера, мегестрол ацепат/мегас), адренокортикостероид (например, гидрокортизон, преднизон), гормон высвобождения лютеинизирующего гормона (и его аналоги и другие LHRH агонисты, например бузерелин и гозерелин), ингибитор ароматазы (например, анастразол/аримидекс, аминоглютетимид/цитраден, экземестан), ингибитор гормона (например, октреотид/сандостатин) и сходные агенты.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть противоанергическим агентом (например, соединения небольших молекул, белки, гликопротеины или антитела, которые нарушают толерантность к опухолям и раковым антигенам). Примерами таких соединений являются молекулы, блокирующие активность CTLA-4, например MDX-010 (Phan et al., PNAS USA 100,8372 (2003)).

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть нуклеиновой кислотой или вектором, содержащими ген супрессора опухоли, например аденовирус с нарушенной реп-

ликацией, кодирующий человеческий рекомбинантный дикий тип p53/SCH58500 и т.д.; противосмысловые нуклеиновые кислоты, направленные на онкогены, мутированные или deregулированные гены; или siPHK, направленные на мутированные или deregулированные гены. Примеры мишеней супрессоров опухолей включают, например, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 и DCC.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть противораковой нуклеиновой кислотой, например генасенс (аугмерозен/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (инкапсулированный в липосомы с-raf противосмысловой олигонуклеотид/1818-5132), MG98 и другие противосмысловые нуклеиновые кислоты, направленные на PKC α , кластерин, IGFБPs, протеинкиназу A, циклин D1 или Bcl-2h.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, может быть противораковой ингибиторной молекулой PHK (см., например, Lin et al., *Curr. Cancer. Drug. Targets.* 1(3), 241-7 (2001), Erratum in: *Curr. Cancer. Drug. Targets.* 3(3), 237 (2003), Lima et al., *Cancer. Gene Ther.* 11(5), 309-16 (2004), Grzmil et al., *Int. J. Oncol.* 4(1), 97-105 (2004), Collis et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57(2 Suppl), S144 (2003), Yang et al., *Oncogene.* 22(36), 5694-701 (2003) и Zhang et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 303(4), 1169-78(2003)).

Композиции и комбинации способов применения согласно настоящему изобретению также включают введение вакцин нуклеиновых кислот, например вакцин с голой ДНК, кодирующей такие раковые антигены/связанные с опухолями антигены (см., например, US 5589466, US 5593972, US 5703057, US 5879687, US 6235523 и US 6387888). В одном варианте реализации комбинированный способ введения и/или комбинированная композиция включает композицию аутологичной вакцины. В одном варианте реализации комбинированная композиция и/или комбинированный способ введения включает вакцину целой клетки или цитокин-экспрессирующей клетки (например, фибробласт, экспрессирующий рекомбинантный IL-2, разветвленные клетки, экспрессирующие рекомбинантный цитокин и т.п.) (см., например, Kowalczyk et al., *Acta Biochim Pol.* 50(3), 613-24 (2003), Reilly et al., *Methods Mol. Med.* 69, 233-57 (2002) and Tirapu et al., *Curr. Gene Ther.* 2(1), 79-89 (2002). Другим примером такого аутологического клеточного подхода, который можно применять в комбинированных способах согласно настоящему изобретению, является MyVax(R) способ персонализированной иммунотерапии (ранее известный как GTOP-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, USA).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает комбинированные композиции и/или комбинированные способы введения, где CD38BP комбинируют или совместно назначают с вирусами, вирусными белками и т.п. Вирусы с нарушенной репликацией, которые обычно способны только к одному или нескольким циклам репликации *in vivo*, и которые нацелены на опухолевые клетки, могут, например, быть полезными компонентами таких композиций и способов. Такие вирусные агенты могут включать или быть связанными с нуклеиновыми кислотами, кодирующими иммуностимуляторы, например GM-CSF и/или IL-2. Как природные онколитические, так и рекомбинантные онколитические вирусы (например, HSV-1 вирусы, реовирусы, аденовирусы с нарушенной репликацией и чувствительной репликацией и т.д.) могут быть полезными компонентами таких способов и композиций. Соответственно, в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает комбинированные композиции и/или комбинированные способы введения, где CD38BP комбинируют или совместно назначают с онколитическим вирусом. Примеры таких вирусов включают онколитические аденовирусы и вирусы герпеса, которые могут быть или могут не быть модифицированными вирусами (см., например, instance Shah et al., *J. Neurooncol.* 65(3), 203-26 (2003), Stiles et al., *Surgery.* 134(2), 357-64 (2003), Sunarmura et al., *Pancreas.* 28(3), 326-9 (2004), Teshigahara et al., *J. Surg. Oncol.* 85(1), 42-7 (2004), Varghese et al., *Cancer Gene Ther.* 9(12), 967-78 (2002), Wildner et al., *Cancer Res.* 59(2), 410-3 (1999), Yamanaka, *Int. J. Oncol.* 24(4), 919-23 (2004) и Zwiebel et al., *Semin. Oncol.* 28(4), 336-43 (2001).

Комбинированные композиции и комбинированные способы введения согласно настоящему изобретению могут также включать способы иммунотерапии с "целой клеткой" или "адоптивные". Например, такие способы могут включать инфузию или повторную инфузию клеток иммунной системы (например, лимфоциты, инфильтрующие опухоль (TILs), например CD4⁺ и/или CD8⁺ T клетки (например, T-клетки, усиленные опухолеспецифичными антигенами и/или генетическими усилителями), экспрессирующие антитела B-клетки или другие продуцирующие/представляющие антитела клетки, древовидные клетки, культивированные с D-усиливающим агентом, например GM-CSF и/или Flt3-L, и/или нагруженные связанные с опухолью антигеном древовидные клетки), противоопухолевые NK-клетки, так называемые гибридные клетки или их комбинации. Клеточные лизаты также можно применять в таких способах и композициях. Клеточные "вакцины" в клинических испытаниях, которые могут быть полезны в таких случаях, включают CanvaxinTM, APC-8015 (дендреон), HSPPC-96 (антигеник) и Melacine[®] клеточные лизаты. Антигены, отпавшие от раковых клеток, и их смеси (см., например, Bystryn et al., *Clinical Cancer Research Vol. 7*, 1882-1887, July 2001), при необходимости смешанные с вспомогательными веществами, как, например, квасцы, также могут быть компонентами в таких способах и композициях.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно доставлять больному в комбинации с приложением способа внутренней вакцинации. Внутренняя вакцинация относится к индуцированной гибели опухолевых или раковых клеток, как, например, индуцированная лекарством или индуцированная радиацией гибель опухолевых клеток у больного, которая обычно приводит к проявлению иммунного ответа, направленного против (1) опухолевых клеток как целого или (2) частей опухолевых клеток, включая (а) секретированные белки, гликопротеины и другие продукты, (б) мембраносвязанные белки или гликопротеины или другие продукты, связанные или погруженные в мембраны, и/или (в) внутриклеточные белки или другие внутриклеточные компоненты. Иммунный ответ, индуцированный внутренней вакцинацией, может быть гуморальным (например, антитело-комплемент опосредованным) или опосредованным клетками (например, развитие или увеличение эндогенных цитотоксических Т лимфоцитов, которые узнают убитые внутри опухолевые клетки или их части). В дополнение к радиотерапии нелимитирующими примерами лекарств и агентов, которые можно применять для индукции упомянутой гибели опухолевых клеток и внутренней вакцинации, являются общепринятые химиотерапевтические агенты, ингибиторы клеточного цикла, противоангиогенные лекарства, моноклональные антитела, агенты, индуцирующие апоптоз, и ингибиторы передачи сигнала.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть пригодными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, являются агенты, индуцирующие дифференциацию, ретиноевая кислота и аналоги ретиноевой кислоты (например, транс-ретиноевая кислота, 13-цис-ретиноевая кислота и сходные агенты), аналоги витамина D (например, сеокальцитол и сходные агенты), ингибиторы ErbB3, ErbB4, IGF-IR, рецептора инсулина, PDGFR α , PDGFR β , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть пригодными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, являются катепсин В, модуляторы катепсин D-дегидрогеназной активности, глутатион-S-трансферазы (например, глутацилцистеин синтаза и лактат дегидрогеназа) и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть пригодными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, являются эстрамустин и эпирубицин.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть пригодными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, являются ингибитор HSP90, как 17-аллил-аминогелд-анамицин, антитела, направленные против опухолевых антигенов, например, PSA, CA125, KSA и т.д., интегрин-подобно интегрину β 1, ингибиторы VCAM и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть пригодными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, являются кальцинейрин-ингибиторы (например, валсподар, PSC 833 и другие MDR-1 или р-гликопротеин ингибиторы), TOR-ингибиторы (например, сиролимус, эверолимус и рапамицин) и ингибиторы механизмов "наведения лимфоцитов" (например, FTY720) и агенты, воздействующие на клеточные сигналы, например ингибиторы адгезии молекул (например, анти-LFA и т.п.).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и радиотерапии субъекту, в них нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и радиотерапии субъекту, в них нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции, чтобы назначать вместе с радиотерапией для лечения множественной миеломы.

Радиотерапия может включать облучение или совместное введение радиоактивных фармацевтических веществ больному. Источник радиации может быть внешним или внутренним относительно больного на лечении (радиационное лечение может, например, быть в форме радиационной терапии с внешним лучом (EBRT), брахитерапии (BT) или радиотерапии нацеленной на скелет). Радиоактивные элементы, которые можно применять в осуществлении таких способов, включают, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-131 и индий-111.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению субъекту, который в этом нуждается, в комбинации с пересадкой аутологичных периферических стволовых клеток или костного мозга.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной

миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению субъекту, который в этом нуждается, в комбинации с пересадкой аутологичных периферических стволовых клеток или костного мозга.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения совместно пересадкой аутологичных периферических стволовых клеток или костного мозга для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению субъекту, который в этом нуждается, в комбинации с ортопедическим вмешательством.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения совместно пересадкой аутологичных периферических стволовых клеток или костного мозга для лечения множественной миеломы.

Ортопедическое вмешательство можно применять для лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38, например множественной миеломы для вспомоществования в контроле боли или сохранении функции или подвижности. Такие вмешательства могут включать физиотерапию, шинирование костей для предотвращения или лечения переломов или хирургические подходы (малые или большие) для лечения переломов.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать в связи с доставкой одного или более агента, которые способствуют доступу CD38BP или комбинированной композиции к внутренности опухоли. Такие способы можно, например, осуществлять вместе с доставкой релаксина, который способен расслабить опухоль (см., например, US 6719977). В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению может быть привязан к проникающему в клетку пептиду (CPP). Проникающие в клетку пептиды или родственные пептиды (например, сконструированные проникающие в клетку антитела) описаны, например, в Zhao et al., J. Immunol. Methods. 254(1-2), 137-45 (2001), Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000), Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76 (2004), Buerger et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129(12), 669-75 (2003), Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77 (1998) и Tseng et al., Mol. Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного противовоспалительного агента субъекту, в этом нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного противовоспалительного агента субъекту, в этом нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения совместно по меньшей мере с одним противовоспалительным агентом для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации такой противовоспалительный агент можно выбирать из стероидных лекарств и NSAID (нестероидных противовоспалительных лекарств).

В одном варианте реализации такой противовоспалительный агент можно выбирать из аспирина и других салицилатов, Сох-2 ингибиторов (например, рофекоксиба и целекоксиба), NSAID (таких как ибупрофен, фенпрофен, напроксен, сулиндак, диклофенак, пироксикам, кетопрофен, дифлунизал, набуметон, этодолак, оксапрозин и индометацин), анти-IL6R антител, анти-IL8 антител, анти-IL15 антител, анти-IL15R антител, анти-CD4 антител, анти-CD11a антител (например, эфализумаб), анти- α -4/ β -1 интегрина (V_LA4) антител (например, натализумаб), CTLA4-Ig для лечения воспалительных заболеваний, преднизолона, преднизона, модифицирующих заболевание противоревматических лекарств (DMARDs), таких как метотрексат, гидроксихлорокин, сульфазалазин, ингибиторов синтеза пиримидинов (например, лефлуномид), агентов, блокирующих IL-1 рецепторы (например, анакинара), агентов, блокирующих TNF- α (например, этанерсепт, инфликсимаб и адалимумаб) и сходные агенты.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного иммуносупрессивного и/или иммуномодуляторного агента субъекту в этом нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одного иммуносупрессивного и/или иммуномодуляторного агента субъекту в этом нуждающемуся.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения совместно по меньшей мере с одним иммуносупрессивным и/или иммуномодуляторным агентом для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент можно выбирать из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты микофенолата мофетила, кортикостероидов, таких как преднизолон, метотрексат, соли золота, сульфасалазин, противомаларийные агенты, брекинар, мизорибин, 15-деокиспергуалин, 6-меркаптопурин, циклофосфамид, рапамицин, такролимус (FK-506), ОКТ3, противотимощитный глобулин, тимопентин, тимозин- α и сходных агентов.

В одном варианте реализации такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент можно выбирать из иммуносупрессивных антител, например антител, связывающихся с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6; IGF, IGF1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, или антител, связывающихся с другими лигандами.

В одном варианте реализации такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент можно выбирать из растворимых IL-15R, IL-10, B7 молекул (B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора регулятора отрицательных Т-клеток (например, антитела против CTLA4) и сходных агентов.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно назначать в комбинации с одним или двумя иммуносупрессивными или иммуномодуляторными агентами, например, в комбинации с преднизолоном и циклоспорином; преднизолоном, циклоспорином и азатиоприном или преднизолоном, циклоспорином и микофенолат мофетилем.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и анти-C3b(i) антитела субъекту, который в этом нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения множественной миеломы, где способ включает введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению и анти-C3b(i) антитела субъекту, который в этом нуждается.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает применение CD38BP согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для введения совместно с анти-C3b(i) антителом для лечения множественной миеломы.

В одном варианте реализации терапевтический агент для применения в комбинации с CD38BP согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, можно выбирать из ингибиторов гистон-деацетилазы (например, фенилбутирата) и/или агентов заживления ДНК (например, ферменты заживления ДНК и родственные композиции, как димеридин).

Способы согласно настоящему изобретению для лечения нарушений, как описано выше, включающие введение терапевтически эффективного количества CD38BP согласно настоящему изобретению, могут также включать направленную против рака фотодинамическую терапию (например, противораковую лазерную терапию, которую при необходимости можно практиковать с применением фотосенсибилизирующего агента, см., например, Zhang et al., J. Control. Release. 93(2), 141-50 (2003)), противораковые терапии с помощью звуковых волн и волновых скачков (см., например, Kambe et al., Hum. Cell. 10(1), 87-94 (1997)) и/или противораковую нутрацевтическую терапию (см., например, Roudebush et al., Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract. 34(U 249-69, viii (2004) и Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004)). Сходным образом, CD38BP согласно настоящему изобретению можно применять для получения фармацевтической композиции для лечения нарушений, как описано выше, чтобы назначать вместе с направленной против рака фотодинамической терапией (например, противораковой лазерной терапией, которую при необходимости можно практиковать с применением фотосенсибилизирующего агента, противораковых терапий с помощью звуковых волн и волновых скачков и/или противораковой нутрацевтической терапией).

Как описано выше, фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно назначать в комбинированной терапии, например, в комбинации с одним или более агентом, относящимся к заболеванию или состоянию, которое надо лечить, либо в виде отдельных фармацевтических композиций, либо в составе рецептур с соединением согласно настоящему изобретению вместе с одним или более дополнительным терапевтическим агентом, как описано выше. Такие комбинированные терапии могут требовать более низких дозировок соединения согласно настоящему изобретению и/или совместно назначаемых агентов, таким способом предотвращая возможные токсические действия или осложнения, связанные с различными монотерапиями.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает CD38BP, который конъюгирован с иммуномодулятором, таким как цитокин, фактор роста стволовых клеток, лимфотоксин (например, TNF, например, TNF α) или гематопэтический фактор. Примеры таких молекул, которые можно применять в качестве конъюгатов, включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 и IL-21, факторы стимуляции роста колоний (например, фактор стимуляции роста колоний гранулоцитов (G-CSF) и фактор сти-

муляции роста колоний гранулоцитов макрофагов (GM-CSF)), интерфероны (например, $IFN\alpha$, $IFN\beta$ и $IFN\gamma$), фактор роста стволовых клеток, называемый "S1 фактор", эритропоэтин и тромбопоэтин, их активные фрагменты, их производные или их любые комбинации.

В одном варианте реализации CD38BP согласно настоящему изобретению можно применять *in vivo* или *in vitro* для диагностики заболеваний, где активированные экспрессирующие CD38 клетки играют активную роль в патогенезе, с помощью детектирования уровней CD38 или уровней клеток, содержащих CD38 на поверхности своей мембраны. Этого можно достигнуть, например, с помощью контактирования образца для тестирования, при необходимости, вместе с контрольным образцом, с CD38BP в условиях, позволяющих образование комплекса между антителом и CD38. Образование комплекса далее детектируют (например, с помощью ELISA). Когда применяют контрольный образец вместе с тестируемым образцом, комплекс определяют в обоих образцах и любая статистически значимая разница в образовании комплекса между образцами указывает на присутствие CD38 в тестируемом образце.

Более специфично, настоящее изобретение обеспечивает способы идентификации и диагностики инвазивных клеток и тканей и других клеток, на которые направлены CD38BP согласно настоящему изобретению и мониторинга прогресса терапевтических лечений, состояния после проведения лечения, риска развития рака, прогрессии рака и т.п.

В одном примере такого диагностического анализа настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики уровня инвазивных клеток в ткани, включающий образование иммунокомплекса между CD38BP и потенциально содержащими CD38BP тканями и детектирования образования иммунокомплекса, где образование иммунокомплекса коррелирует с присутствием инвазивных клеток в ткани. Контактное взаимодействие можно проводить *in vivo*, применяя меченые выделенные антитела и стандартные техники получения изображений, или можно проводить *in vitro* на образцах ткани.

CD38BP можно применять для детектирования CD38-содержащих пептидов и пептидных фрагментов в любом подходящем биологическом образце с помощью пригодных подходов. Примеры общепринятых иммуноанализов, предоставляемые согласно настоящему изобретению, включают без ограничения ELISA, RIA, FACS анализы, анализ с помощью плазмонного резонанса, хроматографические анализы, иммуногистохимию тканей, блоттинг и/или иммунопреципитацию с применением CD38BP. Анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению можно применять для детектирования CD38 и фрагментов CD38 из человека. Подходящие метки для CD38BP и вторичных антител, применяемые в таких подходах, включают, не ограничиваясь этим, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу из хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолин-эстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; примеры люминесцентных материалов включают люминол, примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H .

CD38BP можно также анализировать в биологических образцах с помощью конкурентного иммуноанализа, применяя CD38-пептидные стандарты, меченые детектируемыми веществами, и немеченый CD38BP, например немеченое анти-CD38 антитело. В таком анализе биологический образец, меченный CD38-пептидным стандарт(ы) и CD38BP комбинируют и измеряют количество меченного CD38 стандарта, связанного с немеченым CD38BP. Количество CD38 пептида в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченного CD38 стандарта, связанного с CD38BP.

CD38BP особенно полезны для получения изображений опухолей *in vivo*. Получать изображения связанных с CD38 опухолей *in vivo* можно с помощью любой подходящей техники. Например, можно применять ^{99}Tc -метку или другую метку с помощью другого излучающего γ -лучи изотопа, чтобы помечать анти-CD38 антитела в опухоли или вторичные меченые (например, FITC меченые) CD38BP: CD38 комплексы из опухолей и получать изображение с помощью γ -сцинтилляционной камеры (например, устройство Elscint Apex 409ECT), обычно с применением коллиматора для низких энергий и высокого разрешения или коллиматора для низких энергий и всех целей. Окрашенные ткани можно далее анализировать на радиоактивный счет в качестве индикатора количества CD38-связанных пептидов в опухоли. Изображения, полученные с применением таких техник, можно применять для анализа биологического распределения CD38 у больного, вскармливаемого или в ткани, например, с применением CD38 или фрагментов CD38 в качестве биомаркеров присутствия инвазивных раковых клеток. Варианты такой техники могут включать применения получения изображений с помощью магнитного резонанса (MRI) для улучшения изображений по сравнению с техникой γ -камеры. Сходные способы и принципы иммуносцинтиграфии описаны, например, в Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), and Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993). Такие изображения можно также применять для целевой доставки противорако-

вых агентов, примеры которых описаны в настоящей заявке (например, агенты апоптоза или СНОР химиотерапевтические композиции). Далее такие изображения могут также или альтернативно служить основой для хирургических подходов к удалению опухолей. Далее такое получение изображений *in vivo* может позволять идентифицировать и локализовать опухоли в случае, когда у пациента признано наличие опухоли (из-за присутствия других биомаркеров, метастаз и т.д.), но рак нельзя идентифицировать с помощью традиционных аналитических подходов. Все эти способы являются свойствами настоящего изобретения.

Получение изображений *in vivo* и другие диагностические способы, предоставленные настоящим изобретением, особенно полезны при детектировании микрометастаз у больного человека (например, больного, у которого ранее не диагностировали рак, или больного в периоде выздоровления/ремиссии от рака). Показано, что раковые клетки карциномы, которые могут составлять до 90% всех раковых клеток, окрашиваются очень хорошо с помощью композиций с конъюгатами CD38 антитела. Детектирование с помощью моноклональных анти-CD38 антител и других CD38BP, описанных в настоящей заявке, может указывать на присутствие карцином, являющихся агрессивными/инвазивными, и также или альтернативно предоставлять индикацию осуществимости применения родственных моноклональных анти-CD38 антител, CD38BP или родственных композиций против таких микрометастаз. Далее моноклональные анти-CD38 антитела, направленные на раковые клетки, в большей степени способны отличать такие связанные с раком ткани и клетки от нормальных клеток, с которыми могут быть связаны другие формы CD38.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения изображений *in vivo*, где CD38BP, например анти-CD38 антитело согласно настоящему изобретению, конъюгировано со способствующим детектированию радионепроницаемым агентом, конъюгированное антитело дают хозяину, например, посредством инъекции в кровоток и анализируют наличие и расположение меченых антител у хозяина. С помощью этой техники и любого другого диагностического подхода, предоставленного в настоящей заявке, настоящее изобретение обеспечивает способ скрининга на наличие связанных с заболеванием клеток у больного человека или в биологическом образце, взятом у больного человека.

Для получения изображений с целью диагностики радиоизотопы могут быть связаны с CD38BP прямо или непрямо с применением промежуточной функциональной группы. Применимые промежуточные функциональные группы включают хелаторы, например этилендиаминтетрауксусную кислоту и диэтилентриаминпентауксусную кислоту (см., например, US 5057313). В таких диагностических анализах, включающих конъюгированные с радиоизотопом CD38BP, дозировку конъюгированного пептида, доставляемого больному, обычно поддерживают на возможно наиболее низком уровне посредством подбора изотопа для лучшего сочетания минимального времени полужизни, минимального удержания в организме и минимального количества изотопа, которое позволит детекцию и точное измерение.

В дополнение к радиоизотопам и непроницаемым для радиации агентам диагностические способы можно проводить с применением CD38BP, конъюгированных с красителями (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастирующими агентами, флуоресцентными соединениями или молекулами и усиливающими агентами (например, парамагнитными ионами) для получения изображений с помощью магнитного резонанса (MRI) (см., например, US Pat. № 6331175, описывающий техники MRI и получение антител, конъюгированных с усиливающими MRI агентами). Такие агенты для диагностики/детектирования можно выбирать из агентов для применения в получении изображений с помощью магнитного резонанса и флуоресцентных соединений. Чтобы нагрузить CD38BP, например антитело, соединением с радиоактивными металлами или парамагнитными ионами, может потребоваться взаимодействие его с реагентом, обладающим длинным хвостом, к которому присоединены множественные или хелатирующие группы для связывания ионов. Такой хвост может быть полимером, таким как полилизин, полисахарид или другие дериватизированные или дериватируемые цепи с подвешенными группами, к которым можно присоединять хелатирующие группы, например порфирины, полиамины, краун-эффиры, бистиосемикарбазоны и подобные группы, известные для применения с такой целью. Хелаторы можно присоединить к CD38BP с помощью стандартных химических подходов. Хелаторы обычно связаны с CD38BP, например анти-CD38 mAB, с помощью группы, позволяющей образование связи с молекулой при минимальной потере иммунореактивности и минимальной агрегации и/или внутренней сшивкой. Другие более обычные способы и реагенты для конъюгирования хелаторов с антителами раскрыты, например, в US 4824659. Примеры потенциально пригодных сочетаний металл-хелатор включают 2-бензил-ДТПА и его монометильный и циклогексильный аналоги, применяемые с изотопами для диагностики, по существу, интервале энергии от 60 до 4000 кЭв, например, ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{67}Ga , ^{99}Tc , ^{94}Tc , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O и ^{76}Br для получения радиоизображений. Такие и сходные с ними хелаторы при образовании комплексов с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, могут применяться для MRI диагностических подходов в связи с CD38BP. Макроциклические хелаторы, например NOTA, DOTA и TETA, применимы с разными металлами и радиоактивными металлами, в особенности с радиоактивным галлием, иттрием и медью соответственно. Такие комплексы металл-хелатор можно сделать очень стабильными посредством подбора размера цикла для рассматриваемого металла. Другие хелаторы циклического типа, например макроциклические полиэффиры, которые

нужны для стабильного связывания изотопов, например ^{223}Ra для RAIT, также могут подходить для диагностических способов.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает диагностические конъюгаты CD38BP, где CD38BP конъюгирован с контрастным агентом (например, для получения изображений с помощью магнитного резонанса, компьютерной томографии или агентом, усиливающим ультразвуковой контраст) или радиоактивным изотопом, который может быть, например, излучателем γ -, β -, α -лучей, электронов Оже или позитронов. Дополнительные применимые конъюгированные CD38BP описаны в настоящей заявке в другом месте, которые также могут применяться в диагностических подходах и композициях (например, наборах для диагностики), предоставляемых данным изобретением.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает набор для диагностики рака, включающий контейнер с CD38BP, например с анти-CD38 антителом, и один или более реагент для детектирования связывания CD38BP с CD38 пептидом. Реагенты могут включать, например, флуоресцентные довески (таги), ферментативные таги и другие детектируемые таги. Реагенты могут также включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, где ферментативная реакция производит продукт, который можно увидеть. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает набор для диагностики, включающий один или более CD38BP, например анти-CD38 антитела согласно настоящему изобретению в меченой или немеченой форме в подходящем контейнере(ах), реагенты для инкубации для непрямого анализа и субстраты или дериватизирующие агенты для детекции при таком анализе в зависимости от природы метки. Контрольные реагенты и инструкции по применению также могут быть включены.

Диагностические наборы можно поставлять для применения с CD38BP, например, конъюгированным/меченым анти-CD38 антителом, для детектирования клеточной активности или для детектирования наличия CD38 пептидов в образце ткани или организме хозяина. В таких диагностических наборах, а также в наборах для терапевтического применения, описанных в настоящей заявке, CD38BP обычно предоставлен в лиофилизированной форме в контейнере один или вместе с дополнительными антителами, специфичными для клетки или пептида мишеней. Обычно фармацевтически приемлемый носитель (например, инертный растворитель) и/или его компоненты, например Трис, фосфатный или карбонатный буфер, стабилизаторы, консерванты, биоциды, инертные белки, например бычий сывороточный альбумин и т.п., также включены (обычно в отдельном контейнере для смешивания), а также дополнительные реагенты (также обычно в отдельном контейнере(ах)). В определенных наборах вторичное антитело, способное связываться с анти-CD38 антителом или другими CD38BP, которое обычно находится в отдельном контейнере, также включено. Вторичное антитело обычно конъюгировано с меткой и включено в рецептуру по способу, сходному с таковым для анти-CD38 антитела или другого CD38BP согласно настоящему изобретению.

С помощью способов, описанных выше и в других местах текста, CD38BP можно применять для определения подмножества раковых/опухолевых клеток и характеризовать такие клетки и родственные ткани/разрастания.

В одном примере CD38BP или анти-CD38 антитело можно добавлять к нитроцеллюлозе или к другой твердой подложке, способной к иммобилизации клеток, клеточных частиц или растворимых белков. Такую подложку можно затем промыть подходящими буферами с последующей обработкой меченым CD38 пептидом или антителом. Твердую подложку можно затем промыть буфером второй раз для удаления несвязанного пептида или антитела. Количество связанной метки на твердой подложке можно затем определить с помощью известных способов.

Связанные ферменты, которые реагируют с доступным субстратом, можно применять для получения химического звена, которое можно детектировать, например, спектрофотометрически, флуориметрически или визуальными способами в окружении CD38BP конъюгатов и/или составных белков. Ферменты, которые можно применять для детектируемого мечения CD38BP и анти-CD38 антител, включают малат-дегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероид изомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, α -глицерофосфат-дегидрогеназу, триозофосфат-изомеразу, пероксидазу из хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозоксидазу, β -галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу. Можно также пометить CD38BP флуоресцентным соединением. Когда антитело с флуоресцентной меткой освещают светом нужной длины волны, его присутствие можно детектировать по флуоресценции. Среди наиболее широко применяемых флуоресцентных метящих агентов находятся флуоресцеин изотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид и флуорескамин.

CD38BP, например, анти-CD38 антитела можно также детектируемым способом метить с помощью излучающих флуоресценцию металлов, например ^{152}Eu или других из серии лантанидов. Такие металлы можно присоединять к анти-CD38 антителу, например, с помощью таких хелатирующих металлы групп, как диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

CD38BP и анти-CD38 антитела можно также детектируемым способом пометить с помощью соединения с хемилюминесцентным соединением. Присутствие хемилюминесцентно-меченого CD38BP далее

определяют с помощью детектирования наличия люминесценции, которая появляется по ходу химической реакции. Примерами особенно применимых хемилюминесцентных меток являются люминол, изолуминол, тероматический эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и эфир оксалата.

Сходным образом, можно применять биолюминесцентные соединения, чтобы пометить CD38BP. Биолюминесценция является типом хемилюминесценции, обнаруженной в биологических системах, при которой каталитический белок увеличивает эффективность хемилюминесцентной реакции. Присутствие биолюминесцентного белка определяют по наличию биолюминесценции. Важными биолюминесцентными соединениями для целей внесения метки являются люциферин, люцифераза и экворин.

Детектирование меченого пептида или антитела, фрагмента антитела или производного можно проводить с помощью сцинтилляционного счетчика, например, если детектируемая метка является γ -излучателем, или с помощью флуориметра, например, если метка является флуоресцентным материалом. В случае ферментативной метки детектирование можно проводить с помощью колориметрических способов, включающих субстрат фермента. Детектирование можно также проводить с помощью зрительного сравнения степени ферментативного превращения субстрата по сравнению со сходным образом полученным стандартом.

Эти и другие диагностические приемы можно применять для скрининга любого подходящего материала на CD38 пептиды или CD38 фрагменты. Примеры материалов, которые можно подвергать скринингу, включают, например, кровь, сыворотку, лимфу, мочу, воспалительный экссудат, спинномозговую жидкость, околоплодную жидкость, экстракт или гомогенат ткани и т.п. Однако настоящее изобретение не ограничивается анализом с применением только этих образцов, для специалиста в данной области возможно определить условия, позволяющие применять другие образцы.

Детектирование *in situ* можно проводить посредством взятия у больного биологического образца и добавления комбинации меченых CD38BP, например анти-CD38 антител согласно настоящему изобретению, к такому образцу. CD38BP, анти-CD38 антитело (или фрагмент) согласно настоящему изобретению можно добавлять посредством приложения или наложения меченого CD38BP, например меченого анти-CD38 антитела (или фрагмента) согласно настоящему изобретению на биологический образец. С помощью такой процедуры можно определять не только наличие CD38 или фрагментов CD38, а также распределение таких пептидов в исследуемой ткани (например, для анализа распространения раковых клеток). Применяя настоящее изобретение рядовые специалисты в данной области легко поймут, что любой из широкого разнообразия гистологических подходов (например, процедуры окрашивания) можно модифицировать, чтобы получить такое детектирование *in situ*.

Настоящее изобретение далее предоставляет способ содействия продаже и/или применению CD38BP согласно настоящему изобретению, включающий распространение информации (например, с помощью печатных материалов, которые раздаются, рассылаются и т.п. с помощью рекламы, телевизионных программ и объявлений, с помощью радиопрограмм и объявлений, рассылки участка в Интернете, по электронной почте и посредством телемаркета, с помощью распространения по квартирам и людям, с помощью финансовой поддержки и проведения конференций, панелей, форумов и т.д., посредством найма разносчиков и продавцов и/или медицинских/научных связей, посредством финансирования и проведения научных исследований и публикаций, относящихся к применению и т.д.), относящейся к применению соединения для предотвращения или лечения любого состояния или комбинации состояний, как описано в настоящей заявке, среди любых людей и сообществ возможного интереса (например, фармацевтических цепей, менеджеров формуляров, страховых компаний, НМО, больниц и больничных цепей, других организаций здравоохранения, менеджеров аптечного дела, потенциальных больных, больных раком, ранее больных раком, больных в состоянии ремиссии, терапевтов первого обращения, врачей или фармацевтов и/или лидеров общественного мнения).

Настоящее изобретение также предоставляет наборы, включающие фармацевтические композиции с соединением согласно настоящему изобретению и инструкции для применения. Набор может еще содержать один или более дополнительный агент, например иммуносупрессивный реагент, химиотерапевтический реагент, противовоспалительный агент или радиоизотопный агент, как описано выше, или один или более дополнительный CD38BP согласно настоящему изобретению (например, CD38BP, обладающий комплементарной активностью). Набор согласно настоящему изобретению может также включать диагностические агенты и/или другие терапевтические агенты. В одном варианте реализации набор согласно настоящему изобретению включает CD38BP согласно настоящему изобретению и диагностический агент для диагностики состояния или наличия нарушения, включающего экспрессирующие CD38 клетки у субъекта. В одном варианте реализации набор включает CD38BP согласно настоящему изобретению в высоко стабильной форме (например, в лиофилизированной форме) в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем(ми), который можно смешивать с высокостабильной композицией для получения композиции для инъекций.

Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, процитированные в настоящей заявке, являются таким образом включенными в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и специфично отмечена, как включенная посредством ссылки, и приведенной в настоящей заявке полностью.

Все заголовки и подзаголовки применяются в настоящей заявке только для удобства и не могут рассматриваться как ограничивающие изобретение никоим образом.

Все комбинации вышеописанных элементов во всех возможных вариантах охвачены настоящим изобретением, если не указано иное или если нет ясного противоречия контексту.

Применение терминов и сходных ссылок в контексте описания настоящего изобретения следует рассматривать распространяющимися как на единственное, так и на множественное число, если не указано иное или если нет ясного противоречия контексту.

Указание интервалов и величин в настоящей заявке просто служит как стенографический способ ссылки на каждую отдельную величину, попадающую в интервал, если не указано иное, и каждая отдельная величина включена в описание, как если бы она была индивидуально упомянута. Если не указано иное, все точные величины, предоставленные в настоящей заявке, являются представительными для соответствующих приблизительных величин (например, все примерные величины, предоставленные по отношению к отдельному фактору или измерению, могут считаться предоставляющими соответствующее приблизительное измерение, модифицированное с помощью "приблизительно", если требуется).

Все способы, описанные в настоящей заявке, можно проводить в любом подходящем порядке, если не указано иное или если нет ясного противоречия контексту.

Применение любого и всех примеров или примерных выражений (например, "такой как", "например"), предоставленные в настоящей заявке, предназначены для лучшего понимания настоящего изобретения и не накладывают ограничения на объем притязаний настоящего изобретения, если не указано иное. Никакие выражения в описании не должны рассматриваться как указывающие на важность какого-либо элемента для осуществления настоящего изобретения, пока это не выражено ясно.

Цитирование и включение документов патентов в настоящей заявке производится только для удобства и не дает представления о действительности, патентоспособности и/или возможности применения таких патентных документов.

Описание в настоящей заявке любого варианта реализации настоящего изобретения с применением таких терминов, как "составляющий", "обладающий", "включающий" или "содержащий" по отношению к элементу или элементам охватывает сходные варианты реализации настоящего изобретения, которые "состоят из", "состоят, по существу, из" или "по существу, включают" этот отдельный элемент или элементы, если не указано иное или если нет ясного противоречия контексту (например, композицию, описанную в настоящей заявке, включающую отдельный элемент, следует понимать как описывающую также композицию, состоящую из этого элемента, если не указано иное или если нет ясного противоречия контексту).

Настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутые в вариантах реализации, представленных в настоящей заявке в максимальной степени, разрешенной действующим законодательством.

Все патенты, находящиеся в стадии экспертизы заявки на патент и другие публикации, процитированные в настоящей заявке, включены посредством ссылки полностью.

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

Примеры

Пример 1. Получение трансфицированных люциферазой (Daudi-luc) клеток.

Культуру клеток Daudi (происходящих из лимфомы Беркитта) культивируют в культуральной среде RPMI 1640, дополненной 10% FCS (Optimum C241, Wisent Inc., St. Bruno, QC, Canada), 2 mM L-глутамина, 100 IU/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия (все получены из Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Среду обновляют дважды в неделю. Перед трансфекцией клетки разделяют и засевают при $1-1,5 \times 10^6$ клеток/мл для обеспечения жизнеспособности и оптимального роста.

Трансфекция люциферазой.

$8,2 \times 10^6$ CD38⁺ клеток Daudi отбирают в 300 мкл RPMI (дополненной 10% dFCS, Gibco BRL) и переносят в кювету для электропорации (Biorad, Hemel Hempstead, Herts, UK). Затем добавляют 40 мкг gWIZ люциферазы из GTS (Aidevtron, Fargo, ND, USA) и 10 мкг pPur вектора (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands), придающего устойчивость к пурамицину. После выдерживания клеток на льду в течение 10 мин клетки подвергают электропорации (250 В, 950 мкФ; Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, Munchen, Germany). Клетки опять выдерживают на льду и отбирают в 40 мл RPMI (дополненной 10% FCS). Затем клетки засевают на плиту для культуры тканей на 96 ячеек (100 мкл/ячейку). Через 48 ч добавляют пурамицин (конечная концентрация 1 мкг/мл Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, The Netherlands). Устойчивые к пурамицину клоны далее выращивают на платах для культуры тканей на 24 ячейки.

Определение люциферазной активности.

Люциферазную активность клеток определяют с помощью системы анализа люциферазы (#E4030, Promega, Madison, WI, USA). 1×10^5 клеток центрифугируют (13500 об/мин, 1 мин) в центрифуге фирмы

Эппендорф и осадок промывают в 100 мкл PBS. После центрифугирования (13500 об/мин, 1 мин) осадок лизируют с 20 мкл Reporter Lysis Buffer (Promega), замораживают и оттаивают. После центрифугирования (13500 об/мин, 1 мин), 20 мкл супернатанта отбрасывают и добавляют 100 мкл реагента для люциферного анализа (в специальных люцинометрических пробирках, Promega). Люминесценцию измеряют (10 с) в люцинометре (LB9507, Berthold, Vilvoorde, Belgium).

Пример 2. Иммунизация мышей и получение гибридом.

Протокол иммунизации для -003.

Мышей Hco12 иммунизируют каждые две недели с помощью 20 мкг очищенного HA-CD38. Первую иммунизацию проводят интраперитонеально (i.p.) в присутствии 100 мкл PBS, смешанного с 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA). После первой иммунизации последующие поддерживающие введения (13х) очищенного HA-CD38 проводят в присутствии 100 мкл PBS, смешанного с 100 мкл Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), чередуя s.c. и i.p. После развития титра мышей поддерживают с помощью 20 мкг HA-CD38 в PBS, i.v.

Протокол иммунизации для -005 и -024.

Мышей HCo12 иммунизируют каждые две недели с помощью 20 мкг очищенного HA-CD38, чередуя с NIH-3T3-CD38 трансфицированными клетками. Первую иммунизацию проводят с помощью 5×10^6 клеток в 100 мкл PBS, смешанного с 100 мкл CFA, i.p., вторую и последующие иммунизации с применением HA-CD38 s.c. в присутствии 100 мкл PBS, смешанного с 100 мкл IFA. Следующие иммунизации трансфицированными клетками проводят в присутствии 200 мкл PBS. После развития титра мышей поддерживают с помощью 20 мкг HA-CD38 в PBS, i.v.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека к CD38.

Клетки селезенки мыши выделяют из HCo12 мышей и вводят вместе с ПЭГ в клеточную линию миеломы мыши, основываясь на стандартных протоколах. Получающиеся гибридомы подвергают скринингу на продукцию антител человека с помощью ELISA и на CD38-специфичность с помощью CD38-трансфицированных NS/0 клеток с помощью FACS анализа и на связывание рекомбинантного белка HA-CD38 с помощью ELISA. Отбирают три клеточные линии гибридомы, экспрессирующие моноклональные анти-CD38 антитела человека, -003, -005 и -024 соответственно.

Пример 3. Трансфекция NIH клеток с помощью CD38.

Вектор pcIpuroCD38) для продукции NIH-3T3-CD38 получают от Prof. M. Glennie (Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK). NIH-3T3 клетки (DSMZ, ACC 59; 150000 клеток/ячейку; 0,5 мл; плоскостонная плата на 96 ячеек, Greiner) культивируют в DMEM (дополненной глюкозой (4,5 г/л), 10% FCS, L-глутамин, Na-пируват; BioWhittaker) в течение 24 ч. Затем ДНК (0,8 мкг) и липофектамин (Invitrogen, Breda, The Netherlands) разводят в DMEM и смешивают (20 мин, комн. темп.). Далее смесь (100 мкл) добавляют в каждую ячейку и инкубируют (в течение ночи, 37°C).

Скрининг на экспрессию CD38.

Клетки NIH-3T3-CD38 промывают (в 1 мл PBS) и обрабатывают трипсином (200 мкл, трипсин-ЭДТА, BioWhittaker). Затем добавляют 1 мл DMEM и смесь переносят пипеткой в пробирки для FACS. После центрифугирования (1200 об/мин, 5 мин) клетки промывают в FACS буфере (FB; PBS, 0,05% БСА, 0,02% NaN_3) и суспендируют в 1 мл FB. После центрифугирования (1200 об/мин, 5 мин) супернатант удаляют и добавляют мышьиные античеловеческие CD38-PE (разведение 1/50, Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). После промывки клеток два раза в FB, клетки ресуспендируют в FB для проведения проточной цитометрии.

Разведение и селекция.

После обработки трипсином клетки переносят во флаконы T25 (Greiner) в DMEM (дополненной глюкозой 4,5 г/л, 2 мМ L-глутамином и пурамицином (2 мкг/мл) BioWhittaker). Устойчивые к пурамицину клетки тестируют на стабильность экспрессии CD38 с помощью проточной цитометрии через две недели на среде с пурамицином. Отобранные NIH-3T3-CD38 клетки субклонируют с помощью ограниченного разведения. После размножения клеток все 15 NIH-3T3-CD38 подвергают скринингу на экспрессию CD38. NIH-3T3-CD38 клетки с высокой экспрессией CD38 замораживают в жидком азоте (-80°C) до применения.

Культура NIH-3T3-CD38 клеток.

Клетки культивируют в DMEM (дополненной глюкозой (4,5 г/л), 10% FCS, 2 мМ L-глутамином, Na-пируватом, пенициллином, стрептомицином). Клетки пассируют дважды в неделю с применением трипсина/ЭДТА и засевают в концентрации 1×10^6 клеток/флакон T25. NIH-3T3-CD38 клетки с высокой экспрессией CD38 замораживают в жидком азоте (-80°C) до применения.

Очистка HA-CD38 антигена.

Сепарозу 4B (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) сопрягают с анти-CD38 антителом (Serotec, Oxford, UK). Колонку (колоночная трубка HR5/20 упакована на 12 см носителя в высоту, объем колонки 2,4 мл; максимальная скорость тока 0,5 мл/мин) уравнивают по меньшей мере 5 об. колонки (CV) буфера PBS. Образцы фильтруют и наносят на колонку. Колонку промывают PBS, пока сигнал не вернется на базовую линию (приблизительно 3 CV). Элюцию проводят 0,1M глицином при pH 2. Элюиро-

ванные фракции нейтрализуют 1% (v/v) 2М Трис-НСl, рН 9.

Очистка анти-CD38 антител.

Анти-CD38 антитела человека очищают из супернатантов культуры ткани. Во-первых, супернатанты фильтруют через 0,2 мкм фильтр с прямым потоком. Затем супернатант наносят на 5 мл колонку с белком А (rProtein A FF, Amersham Bioscience) и элюируют 0,1М лимонной кислотой-NaOH, рН 3. Элюат немедленно нейтрализуют с помощью 2М Трис-НСl, рН 9 и диализуют в течение ночи против 12,6 мМ фосфата натрия, 140 мМ NaCl, рН 7.4 (B. Braun, Oss, The Netherlands). После диализа образцы стерилизуют фильтрованием через 0,2 мкм фильтр с прямым током.

Очистка партий His-CD38.

Белок находится в супернатанте клеточной культуры клеток, экспрессирующих His-CD38 с конструкцией ДНК, содержащей последовательность для внеклеточного домена CD38. Дополнительная последовательность из нескольких остатков гистидина (poly-His-tag) включена в конструкцию и находится на N-конце белка. Такой таг позволяет очищать с помощью хроматографии на аффинной колонке с иммобилизованным металлом. В этом процессе хелатор, зафиксированный на хроматографическом носителе, заряжен катионами Co^{2+} . В частности, последовательность, которая включает 6 аминокислотных остатков гистидина, прочно связывает Co^{2+} . Поэтому CD38 белки с гистидиновым тагом прочно связываются с такой колонкой, в то время как другие присутствующие в культуральном супернатанте белки проходят сквозь колонку или вымываются. Прочносвязанные белки CD38 с гистидиновым тагом затем элюируют буфером, содержащим имидазол, который конкурирует с гистидином за связывание с Co^{2+} . Когда очищено достаточно His-CD38, элюент удаляют из белка с помощью замены буфера на колонке для обессоливания.

Пример 4. Связывание -003, -005 и -024 с CD38-трансфицированными CHO (CHO-CD38) клетками, с Daudi-luc клетками и свежими опухолевыми клетками множественной миеломы (ММ)

После сбора и подсчета Daudi-luc клетки, CHO клетки, трансфицированные CD38, и контрольные клетки ресуспандируют в (PBS 1×10^6 клеток/мл). Затем клетки помещают на платы с V-образным дном на 96 ячеек (100 мкл/ячейку) и дважды промывают в PBS-BCA (PBS, дополненный 0,1% BCA и 0,02% азида натрия). Затем 50 мкл раствора антитела в PBS-BCA добавляют к клеткам (4°C, 30 мин). После трехкратной промывки в PBS-BCA добавляют 50 мкл (1:400 разведение) кроличьего античеловеческого IgG-FITC в PBS-BCA (4°C в темноте 30 мин). Клетки промывают три раза и специфическое связывание CD38-антител с CHO-CD38 и Daudi-luc клетками детектируют с помощью проточной цитометрии. Hu-Mab-KLH (моноклональное антитело человека против KLH (гемоцианина моллюска морское блюдечко), полученное в Genmab B. V., Utrecht, The Netherlands с помощью протоколов иммунизации, описанных в настоящей заявке в другом месте) применяют в качестве контроля. Фиг. 1 и 2 показывают, что -003, -005 и -024 связываются с CHO-CD38 клетками и с Daudi-luc клетками, хотя и с разными EC_{50} (табл. 1). Никакого связывания с контрольными CHO клетками не наблюдалось (данные не показаны). Свежие ММ опухолевые клетки получают от Dr. Lokhorst (University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands). Клетки опухоли выделяют из костного мозга больных множественной миеломой с помощью центрифугирования в градиенте фикола (Bio Whittaker; среда разделения лимфоцитов, номер по каталогу 17-829E). После сбора и подсчета клетки ММ (100,000 клеток/ячейку) ресуспандируют с 25 мкл FITC-меченых CD38-специфичных антител и 25 мкл CD138. После инкубации (4°C, 30 мин) клетки промывают в PBS-BCA и добавляют PE-меченые козы антимышинный иммуноглобулин (1:200 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Soham, UK). После инкубации (4°C, 30 мин) и промывки клеток в PBS-BCA измеряют флуоресценцию с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 3 показывает, что -003, -005 и -024 связываются с ММ клетками.

Таблица 1

Величины EC_{50} для связывания анти-CD38 антител на CHO-CD38 клетках, Daudi-luc клетках и свежих ММ опухолевых клетках

CD38-специфичные антитела	EC_{50} CHO-CD38 (мкг/мл)	EC_{50} Daudi-luc (мкг/мл)	EC_{50} ММ клетки (мкг/мл)
-003	0,54	0,26	0,56
-005	0,23	0,09	0,04
-024	0,08	0,05	0,02

Пример 5. Зависимая от антитела опосредованная клеткой цитотоксичность.

Клетки Daudi-luc, свежие опухолевые клетки множественной миеломы, свежие опухолевые клетки лейкоза плазматических клеток и клетки множественной миеломы JK6L и АМО-1 собирают (5×10^6 клеток) в RPMI^{++} (культуральная среда RPMI 1640, дополненная 10% большой сыворотки теленка (HyClone, Logan, UT, USA)), к которой добавляют 100 μCi ^{51}Cr (Chromium-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands) и смесь инкубируют в водяной бане на 37°C в течение 1 ч. После промывки клеток (дважды в PBS, 1500 об/мин, 5 мин) клетки суспендируют в RPMI^{++} и считают с помощью эксклюзии трипанового синего. Клетки доводят до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

Получение эффекторных клеток.

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (здоровые добровольцы, UMC Utrecht,

Utrecht, The Netherlands) выделяют из 40 мл гепариновой крови с помощью фикола (Bio Whittaker; среда разделения лимфоцитов, кат. № 17-829E) согласно инструкции производителя. После суспендирования клеток в RPMI^{++} клетки считают с помощью эксклюзии трипанового синего и доводят до концентрации 1×10^7 клеток/мл.

Постановка ADCC.

50 мкл ^{51}Cr -меченых клеток-мишеней помещают с помощью пипетки на плату на 96 ячеек и добавляют 50 мкл антитела, разведенного средой RPMI^{++} (конечные концентрации 10, 1, 0,1, 0,01 мкг/мл). Клетки инкубируют (комн.темп., 15 мин) и добавляют 50 мкл эффекторных клеток, что приводит к соотношению эффектора к мишени 100:1 (для определения максимального лизиса добавляют 100 мкл 5% Тритона X-100 вместо эффекторных клеток; для определения спонтанного лизиса добавляют 50 мкл клеток-мишеней и 100 мкл RPMI^{++}). Клетки центрифугируют (500 об/мин, 5 мин) и инкубируют (37°C , 5% CO_2 , 4 ч). После осаждения клеток (1500 об/мин, 5 мин) собирают 100 мкл супернатанта в пробирки microtiter и считают с помощью γ -счетчика. Процент специфического лизиса рассчитывают следующим способом:

$$(\text{срм образца} - \text{имп/мин только клеток-мишеней}) / (\text{срм максимального лизиса} - \text{срм только клеток-мишеней}),$$

где срм означает импульсы в минуту.

В клетках Daudi-luc (фиг. 4 и табл. 2) -003, -005 и -024 индуцируют лизис с помощью ADCC, -005 и -005 проявляют себя несколько лучше, чем ритуксимаб (анти-CD38 mAb). Интересно, что при применении свежих опухолевых клеток множественной миеломы (полученных от Dr. H. Lokhorst, UMCU, The Netherlands) в качестве клеток мишени, ADCC индуцируется антителами -003, -005 и -024 (фиг. 5 и табл. 2).

Таблица 2

Величины EC_{50} для CD38-специфичных антител, полученные в ADCC

CD38-специфичные антитела	EC_{50} Daudi-luc (нг/мл)	EC_{50} ММ клетки (нг/мл)
-003	9,0	27
-005	4,5	5,7
-024	9,7	56

Обогащение мононуклеарных клеток Erlangen периферической крови человека.

Кровь людей-добровольцев (университет Эрланген, Erlangen, Germany) разводят дважды средой RPMI 1640 и наслаивают клетки крови на фикол (среда разделения лимфоцитов 1077 г/мл, 710 г, комн.темп, 20 мин; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgium, cat. 17-829E, lot no. 014832). Мононуклеарные клетки периферической крови (MNCs) собирают из интерфазы, промывают и суспендируют в культуральной среде RPMI 1640, дополненной 10% FCS, 2 mM L-глутамином, 5 ед/мл пенициллин, 50 мкг/мл стрептомицина (все от BioWhittaker), к которой добавляют 25 mM HEPES (BioWhittaker).

Постановка ADCC II.

Клетки-мишени (свежие опухолевые клетки лейкоза плазматических клеток, JK6L и АМО-1 линии В-клеток от Dr. T. Valerius, University of Erlangen, Erlangen, Germany) метят с помощью $20 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) в течение 2 ч. После промывки большим количеством RPMI-10 клетки доводят до 1×10^5 клеток/мл. MNCs (50 мкл), сенсibilизированные антителом (50 мкл) и RPMI-10 (50 мкл) помещают на круглодонные микротитровальные планшеты для (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Анализ начинают добавлением свежих опухолевых клеток лейкоза плазматических клеток, JK6L или АМО-1 клеток (50 мкл) с получением конечного объема 200 мкл. Применяют соотношение эффектора к мишени (Э:Т) 40:1. После инкубации (3 ч, 37°C) реакцию останавливают посредством центрифугирования и высвобождение ^{51}Cr измеряют с тройным повтором в импульсах в минуту (срм) в сцинтилляционном счетчике. Процент клеточной токсичности рассчитывают с помощью следующей формулы:

$$\% \text{ специфического лизиса} = (\text{экспериментальный срм} - \text{базовый срм}) / (\text{максимальный срм} - \text{базовый срм}) \times 100,$$

где максимальное высвобождение ^{51}Cr определяют с помощью добавления перхлорной кислоты (3% конечная концентрация) к клеткам мишени и базовое высвобождение измеряют в отсутствие сенсibilизированных антител и эффекторных клеток.

У обеих клеточных линий множественной миеломы (JK6L и АМО-1) лизис индуцируется как -003, так и -005 (фиг. 6 и 7), даже когда экспрессия CD38 низкая (АМО-1 линия клеток).

-003, -005 и -024 индуцируют ADCC первичных опухолевых клеток лейкоза плазматических клеток (фиг. 5Б).

Пример 6. Зависимая от комплемента цитотоксичность.

После сбора и подсчета клеток Daudi-luc жизнеспособность клеток должна быть $\geq 90\%$. После промывки (PBS) клетки суспендируют при концентрации 2×10^6 клеток/мл в RPMI-B (RPMI, дополненная 1% БСА). Затем помещают в круглодонные платы на 96 ячеек при концентрации 1×10^5 клеток/мл (50

мкл/ячейку). Затем добавляют 50 мкл антител на ячейку (конечная концентрация в интервале 0-100 мкг/мл (трехразовое разведение в RPMI-B)). После инкубации (комн.темп., 15 мин) добавляют 11 мкл объединенной сыворотки человека (от 18 здоровых доноров) в каждую ячейку (37°C, 45 мин). Содержимое ячеек суспендируют один раз и 120 мкл переносят в пробирки для FACS (Greiner). Затем добавляют к этой суспензии 10 мкл пропидий йодида (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.) (10 мкг/мл раствора). Лизис детектируют с помощью проточной цитометрии (FACScalibur(TM), Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) с помощью измерения процента мертвых клеток (соответствующего PI-положительным клеткам).

Фиг. 8 и табл. 2 показывают, что лизис Daudi-luc клеток индуцируется -005 (около 60% максимального лизиса) и что лизис за счет -003 наблюдается только при очень высоких концентрациях антитела. -024 не индуцирует CDC на Daudi-luc клетках (данные не приведены). У CHO CD38 клеток лизис индуцируется как -003, -005 так и -024 (фиг. 9 и табл. 3). Лизис с помощью -003 индуцируется при высоких концентрациях. В опухолевых клетках (все получены от Dr. Lokhorst and Dr. Bloem, University Medical Center Utrecht, The Netherlands), полученных от разных больных с MM (А: 3% упорных опухолевых клеток, Б: 9% упорных опухолевых клеток, В: 30-40% опухолевых клеток и Г: 70% опухолевых клеток), CDC-опосредованный лизис наблюдается в присутствии -005, но не в присутствии -003 (фиг. 10). -024 также индуцирует лизис MM опухолевых клеток (фиг. 10Д).

Таблица 3

Величины EC_{50} для CD38-специфичных антител, полученные в CDC

CD38-специфичные антитела	EC_{50} Daudi-luc (мкг/мл)	EC_{50} CD38-CHO (мкг/мл)
-003	>90	3,14
-005	0,33	0,14
-024	>90	0,24

Пример 7. Исследования перекрестного блокирования с применением FACS CHO-CD38 клетки инкубируют с избытком немеченого CD38-специфичного антитела (4°C, 15 мин). Затем клетки инкубируют с FITC-мечеными CD38-специфичными антителами (концентрации приблизительно EC_{90} , 4°C, 45 мин). После двукратной промывки клеток PBS-БСА измеряют флуоресценцию с помощью проточной цитометрии. Фиг. 11 показывает, что немеченые -003 блокируют связывание FITC-меченых -003, в то же время связывание FITC-меченых -005 не блокируется. Также, немеченые -005 блокируют связывание FITC-меченых -005, в то же время связывание FITC-меченых -003 не блокируется. -003 и -005 связываются с различными эпитопами, поскольку они не конкурируют за связывание.

Пример 8. Исследования перекрестного блокирования с помощью ELISA.

Растворимыми человеческими CD38 покрывают поверхность пластины ELISA. Такие CD38 инкубируют с избытком немеченых CD38-специфичных антител в течение приблизительно 15 мин и затем добавляют биотинилированные CD38-специфичные антитела (концентрации приблизительно EC_{90} , комн. темп., 1 ч). После трехкратной промывки с помощью PBS/Tween добавляют стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP), и смесь инкубируют при комн. темп. в течение 1 ч. Комплекс можно детектировать с помощью добавления раствора ABTS и превращение субстрата, опосредованное HRP измеряют с помощью регистрирующего устройства ELISA при 405 нм.

Пример 9. Исследования перекрестного блокирования с помощью сэндвич-ELISA CD38-специфичными антителами покрывают поверхность пластины ELISA.

Связанные с пластиной антитела инкубируют с биотинилированными растворимыми CD38 в присутствии CD38-специфичных антител в жидкой фазе. После промывки с помощью PBS/Tween связанные биотинилированные CD38 детектируют с помощью стрептавидина, конъюгированного с HRP, в течение 1 ч при комн. темп. Этот комплекс можно детектировать с помощью добавления раствора ABTS (после промывки PBS-Tween) и превращение субстрата, опосредованное HRP измеряют с помощью регистрирующего устройства ELISA при 405 нм.

Пример 10. Реактивность с рядом тканей человека и перекрестная реактивность с тканями обезьяны *супотолгус*, определяемая с помощью иммуногистохимии.

Срезы замороженных тканей человека (полученные от Dr. H. Niessen, Free University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) или тканей обезьяны (Inveresk Research, Glasgow, Scotland) разрезают на 6 мкм и сушат на воздухе в течение ночи. Такие криостат-срезы фиксируют в ацетоне (комн. темп, 10 мин) и сушат на воздухе (около 5 мин). Затем срезы инкубируют с 1× буфером лимонная кислота/фосфат, содержащим 0,1% H_2O_2 (pH 5,8; Sigma) для блокирования эндогенной пероксидазы. Через 20 мин при комн.темп. срезы промывают два раза в PBS и 0,05% Tween-20 (PBST, комн. темп., 5 мин, Riedel de Haen, Germany). Затем срезы инкубируют с авидином (комн. темп., 15 мин, DAKO, Glostrup, Denmark), промывают два раза в PBST и инкубируют с биотином (комн. темп., 15 мин, DAKO) для блокирования эндогенного биотина. После промывки срезов два раза в PBST срезы преинкубируют с PBST⁺⁺ (PBST, дополненный 10% нормальной сывороткой человека (NHS, CLB, Amsterdam, Netherlands) и 10% нормальной сывороткой козы (NGS; DAKO) (комн. темп., 20 мин). После удаления преинкубированной сыворотки срезы инкубируют с FITC-мечеными первичными антителами, разведенными 2% PBST⁺⁺ при указанных концентрациях (комн.темп., 60 мин). Далее срезы инкубируют с кроличьими анти-FITC

(1:1000, DAKO) в 2% PBST⁺⁺ (комн. темп., 30 мин). После промывки в PBST срезы инкубируют с козьими антикरोличьими биотинилированными антителами (1:400, DAKO) в 2% PBST⁺⁺ (комн. темп., 30 мин). Затем срезы промывают и инкубируют с SABC-HRP (1:100; DAKO) в 2% PBST⁺⁺ (комн. темп., 30 мин). После промывки секций в PBST два раза их инкубируют (комн. темп., 10 мин) с аминоэтилкарбазол (AEC)-проявляющим раствором (50 mM ацетатный буфер, pH 4,9, 0,01% H₂O₂, Riedel-de-Haen). Под конец срезы промывают очищенной водой (Millipore) (5 мин) и окрашивают гематоксилином (DAKO). С помощью глицергеля (37°C) срезы фиксируют под покровными стеклами и исследуют с помощью световой микроскопии (Axiovision-2; Zeiss, Thornwood, NY, USA).

Бронхиальный эпителий окрашивается с помощью -003 и -005 (фиг. 12Б и 13Б), а также поперечно-полосатые мышцы (миоциты, фиг. 12В и 13В), макрофаги, лимфоциты и плазматические В-клетки (фиг. 12А и 13А). -024 проявляет сходное окрашивание поперечно-полосатых мышц и бронхиального эпителия, но окрашивание менее интенсивно. Никакого окрашивания эндотелиальных клеток не наблюдается ни с -003 (фиг. 14Г), -005 (14Д), ни с -024 (данные не приведены), в то время как отчетливое окрашивание наблюдается с антителами положительного контроля против маркеров эндотелиальных клеток CD31 (фиг. 14А) и vWF (14Б). Анти-KLH применяют как антитело отрицательного контроля (фиг. 14В). -003 (фиг. 12Г) и -024 (данные не приведены), но не -005 (фиг. 13Г) проявляют перекрестную реактивность с лимфоидной тканью обезьяны.

Пример 11. Перекрестная реактивность с мононуклеарными клетками периферической крови обезьяны циномолгус или резус (PBMCs), измеряемая с помощью проточной цитометрии.

5 мл периферической крови обезьяны циномолгус (Inveresk Research) лизируют с помощью добавления 4,5 мл шок-буфера (1,7 mM NH₄Cl, 1 mM ЭДТА), 40 мл H₂O и 450 мкл 10% KHCO₃). После гемолиза клетки центрифугируют (12000 об/мин, 10 мин) и трижды промывают в PBS. После подсчета клеток с помощью эксклюзии трипанового синего клетки суспендируют в PBS-BCA (1×10⁶ клеток/мл).

17,5 мл периферической крови обезьяны резус (BPRC, Rijswijk, The Netherlands) разводят 1:1 в RPMI 1640 и наслаивают на фикол (1,077 г/мл; BioWhittaker, cat. 17-829E, lot no. 0148 32). После центрифугирования (710 г, комн. темп., 20 мин) интерфазу собирают и дважды промывают в RPMI. После последней промывки клетки суспендируют в RPMI при концентрации 1×10⁵ клеток/50 мкл.

Далее клетки переносят на плату на 96 ячеек (100000 PBMCs/ячейку), промывают FACS буфером (PBS, 0,05% BCA, 0,02% NaN₃) и инкубируют с первичными антителами (4°C, 30 мин). После промывки в PBS-BCA добавляют 50 мкл FITC-меченых rb-anti-hlgG (DAKO, Glostrup, Denmark) (4°C, 30 мин). Под конец клетки собирают в FACS пробирках в общем объеме 150 мкл. Образцы измеряют и анализируют с помощью FACScalibur(TM) (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA).

Измеренная с помощью проточной цитометрии перекрестная реактивность -003, но не -005 показана с лимфоцитами циномолгус (фиг. 15А) и моноцитами (фиг. 15Б). Также в случае обезьяны резус наблюдается перекрестная реактивность -003, но не -005 на мононуклеарных клетках (фиг. 15В).

Пример 12. Эксперименты по интернализации.

CHO-CD38 клетки окрашивают при насыщающей концентрации FITC-меченых CD38-специфичных антител (на льду, 30 мин). После помывки клеток (в RPMI1640 дополненной 10% FCS) одну порцию клеток нагревают до 37°C для проведения интернализации и другую порцию оставляют на льду. Через определенные интервалы времени (0-120 мин) аликвоты клеток отбирают и переносят в охлажденный на льду PBS-BCA, чтобы остановить интернализацию. После промывки образцов два раза в PBS-BCA добавляют этидий бромид (разведенный в PBS-BCA, конечная концентрация 2 мг/мл) для тушения мембрано-связанного FITC. Флуоресценцию измеряют с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 16А и 16Б показывают, что -003 и -005 интернализированы CHO-CD38 клетками в течение 5 мин при 37°C.

Пример 13. Эксперименты in vivo со SCI D-люциферазой.

В этой модели опухолевые клетки трансфицируют люциферазой светляков. При даче люциферина (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) мышам меченые клетки можно детектировать in vivo с помощью получения билюминесцентных изображений с применением высокочувствительной CCD камеры, см. Wetterwald et al., American Journal of Pathology 160(3), 1143-1153 (2002).

Клетки Daudi трансфицируют gWIZ люциферазой из Gene Therapy Systems (San Diego, CA) и культивируют в RPMI с 10% FCS1 пенициллин/стрептомицин, пируват натрия и 1 мкг/мл пуромидина (Sigma). Клетки анализируют на экспрессию люциферазы (выраженной в RLU/1×10⁵ клеток) в люцинометре и на экспрессию CD38 с помощью FACS. 2,5×10⁶ трансфицированных люциферазой клеток Daudi на мышью впрыскивают i. v. SCID мышам. Мышей обрабатывают -003, -005, антителом контрольного изотипа (HuMab-KLH) или ритуксимабом (анти-CD20 антителом). Антитела вводят внутривенно. Применяют четыре постановки обработки антителом (см. табл. 4). При превентивной постановке антитело (100 мкг/мышь) и клетки дают одновременно. При терапевтической постановке I антитела (300 мкг/мышь) вводят через 7 дней после введения клеток. При терапевтической постановке II антитела (10 мкг/мышь) вводят через 14 дней после введения клеток. При терапевтической постановке III антитела (100 мкг/мышь) вводят через 7 дней после введения клеток. Для получения изображений мышью подвер-

гают анестезии i.p. с помощью, например, инъекции смеси кетамин/ксилазин/атропин. Синтетический Д-люциферин (натриевая соль, Molecular Probes) дают i.p., например, в дозе 25 мг/мл. Мышей затем помещают в освещенный закрытый ящик и через 3 мин начинают снимать изображение с помощью VersArray 1300В охлаждаемого жидким азотом CCD детектора (Roper Scientific). Фотоны, испускаемые люциферинном, считают при времени экспозиции 5 мин. При освещении делают черно-белые изображения для сравнения. Для сбора данных и анализа изображений применяют программный пакет MetaVue software (Universal Imaging Corp). Статистическую значимость разницы между группами устанавливают с помощью одностороннего анализа отклонения с помощью теста Ньюмана-Койлс (Newman-Keuls post test), применяя GraphPad PRISM version 3.02 (Graphpad Software Inc).

Таблица 4

Постановки обработки антителом для экспериментов с люциферазой in vivo		
Постановка эксперимента	Обработка антителом (дни после инокуляции клеток)	Доза антитела (мкг/мышь)
Профилактический режим	0	100
Терапевтический режим I	7	300
Терапевтический режим II	14	10
Терапевтический режим III	7	100

Фиг. 17А и 17Б показывают, что -003 и -005 ингибируют рост опухолевых клеток при профилактическом режиме и терапевтическом режиме I, сходным образом с ингибированием, наблюдаемым для анти-CD38 антитела. Оба антитела проявляют себя значительно лучше, чем антитело контрольного изотипа. Также при терапевтическом режиме II CD38 антитела замедляют рост опухолевых клеток Daudi-luc (фиг. 17В). При терапевтическом режиме III -003 и -024 показывают ясное ингибирование роста опухолевых клеток Daudi-luc (фиг. 17Г).

Пример 14. Апоптоз.

Анализ апоптоза проводят согласно инструкциям производителя (Annexin-V Apoptosis kit, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Netherlands). Вкратце, CD38 mAbs добавляют к 2×10^5 клеток (трансфицированных люциферазой клеток Daudi в 0,5 мл RPMI⁺⁺ на плате на 24 ячейки) в концентрации 5 мкг/мл -003 или -005, или анти-CD38 антител самих по себе или в присутствии перекрестно-блокирующих rb-anti-hlgG (50 мкг/мл).

После инкубации (37°C, 5% CO₂, 20 ч) клетки осторожно собирают и промывают буфером связывания (1200 об/мин, 4°C, 5 мин, BD Biosciences). Осадок суспендируют в 100 мкл буфера связывания. Затем к суспензии добавляют 5 мкл Annexin-V-FITC (BD Biosciences) и 10 мкл PI (BD Biosciences) и инкубируют в течение 15 мин при комн. темп.

Добавляют 400 мкл буфера связывания и образцы промеряют (PI считывание в FL2). Для анализа апоптических клеток все Annexin-V-положительные клетки считают с помощью проточной цитометрии с помощью прибора FACScalibur flow cytometer с программным пакетом CellQuest pro (BD Biosciences). Для анализа собирают по меньшей мере 10000 событий. Такая популяция включает как PI-положительные, так и PI-отрицательные клетки.

Фиг. 18 показывает, что -003 и -005 не индуцируют апоптоз. Однако после сшивки апоптоз клеток мишени наблюдается. -003 после сшивки индуцируют апоптоз, который близок к апоптозу, индуцированному анти-CD20 антителом (ритуксимаб). -005 менее способен к индукции апоптоза после сшивки. Сходные результаты получены с RAMOS клетками в качестве мишени (данные не приведены).

Пример 15. Действие -005 на тканевой трансплантат В-клеток в RA-SCID мышинной модели.

Имплантация синовиальной ткани.

Мышей SCID, штамм C.B.-17/lcrCrl-SCID-bg, самцов/самок, 4-12 недель, полученных от Charles River Laboratories Nederland (Maastricht, the Netherlands), держат в IVC клетках в стандартных условиях температуры и освещения и кормят лабораторным кормом и поят водой по потребности. Перед имплантацией мышей (три мыши в каждой опытной группе, день 0) анестезируют с помощью внутривенной инъекции кетамина (NIMATEK, EuroVet) и ксилазина (Rompun, Bayer) в соотношении 1:1. Делают небольшие надрезы кожи с помощью хирургических ножниц. Воспаленную синовиальную ткань от больного ревматоидным артритом, претерпевшего замену сустава, имплантируют подкожно в виде кластера из шести небольших фрагментов (всего 2-3 мм³) на каждый бок мыши. Раны закрывают с помощью цианоакрилатного клея Permacol. На 1-й день эксперимента оставшуюся синовиальную ткань анализируют, чтобы проверить на В-клетки в воспаленных синовиальных трансплантатах. -005 (12 мкг/кг) или контрольное антитело (анти KLH, 30 мкг/кг) вводят посредством инъекции i.v. в объеме 200 мкл на 8-й день эксперимента. Под конец эксперимента (14-й день) мышей умерщвляют с помощью ингаляции углекислого газа и извлекают синовиальные трансплантаты. Один из трансплантатов быстро замораживают в соединении OCT (TissueTek, Sacura Finetek Europe) для дальнейшего иммуногистохимического анализа и другой замораживают посредством погружения в жидкий азот для дальнейшего анализа РНК.

Иммуногистохимия.

Готовят 5 мкм криосрезы на SuperFrost (Menzel GmbH, Braunschweig) предметных стеклах с помощью LEICA CM1900 криостата и хранят при -80°C. Размороженные срезы фиксируют в ацетоне в течение

ние 10 мин, сушат при комн. темп. и промывают 3×5 мин в PBS. Все этапы проводят при комнатной температуре. Эндогенную пероксидазную активность блокируют посредством инкубации с PBS, дополненной 0,3% перекисью водорода и 0,1% азидом натрия в течение 20 мин. Стекла затем промывают 3×5 мин в PBS и инкубируют с 10% нормальной сывороткой человека (NHS)/10% нормальной сывороткой кролика (NRbS) в PBS/1% БСА в течение 30 мин. Далее первичные антитела (мышинные mAb), разведенные в PBS, дополненном 10% NHS/10% NRbS, инкубируют в течение 60 мин. После 3×5 мин промывок в PBS добавляют HRP конъюгаты (козьи антимышинные Ig-HRP; DAKO P0447), разведенные 1:50 в PBS (дополненной 1% БСА/10% NHS/10% NRbS) в течение 30 мин. Сигнал пероксидазы усиливают с помощью TSA™ биотинной системы (Perkin Elmer Life Sciences, NEL700). Стекла промывают 3×2 мин в PBS и инкубируют с биотинил тирамидом, разведенным 1:1600 буфером для амплификации в течение 30 мин. После 3×5 мин промывок в PBS добавляют стрептавидин-HRP, разведенные 1:400 в PBS (дополненной 1% БСА) на 30 мин. Стекла промывают 3×5 мин в PBS и инкубируют с раствором DAB (DAKO Cyto-mation K3465) в течение 5 мин. Цветную реакцию останавливают с помощью дистиллированной воды. Под конец, стекла окрашивают гематоксилином (MERCK), промывают под струей воды и покрывают глицерином Кайзера и покровным стеклом.

Оценка интенсивности окрашивания.

Оценку окрашенных трансплантатов синовиальной ткани проводят слепым способом с помощью двух тренированных людей. Вначале выбирают сильнее всего окрашенный срез из серии срезов и этому срезу сравнения присваивают максимальный балл 8. Интенсивность окрашивания других срезов оценивают по шкале от 0 до 8 относительно среза сравнения.

Статистический анализ.

Оценку (баллы) интенсивности окрашивания анализируют с помощью Kruskal-Wallis одностороннего теста ANOVA с последующим тестом множественного сравнения Данна (Dunn's multiple comparison test), применяя Graph Pad Prism version 4.01 (Graph Pad software, Inc., San Diego, CA, USA).

Фиг. 19 и фиг. 21 показывают, что число анти-CD38-положительных плазматических клеток уменьшено после обработки -005. Окрашивание плазматических клеток анти-CD138 подтверждает, что -005 приводят к уменьшению числа плазматических клеток (фиг. 20 и 22).

Пример 16. Секвенирование кодирующих последовательностей человеческих антител против CD38. Получение РНК.

Общую РНК получают из 5×10^6 клеток клеточной линии гибридомы, экспрессирующей моноклональные антитела -003, -005 и -024, соответственно, с помощью набора RNeasy kit (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands) согласно инструкции производителя.

Получение кДНК -003, -005 и -024.

5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) из РНК получают из 100 нг общей РНК, применяя набор SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech) согласно протоколу производителя.

Олигонуклеотидные праймеры синтезируют и оценивают количественно с помощью Isogen Bioscience (Maarssen, The Netherlands). Праймеры растворяют в воде в концентрации 100 пмоль/мкл и хранят при -20°C. Все ПЦР праймеры и праймеры для секвенирования приведены в табл. 5. Для ПЦР применяют ДНК полимеразу PfuTurbo(R) Hotstart (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands; product #600322) согласно инструкции производителя. Каждая реакционная смесь содержит 200 мкМ смешанных дНТФ (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands; product 1814362), 12 пмоль обратного праймера (RACEG1A1 для V_H3003-005, RACEV_HApaI для V_H3003-003 и RACEV_LBsiWI для V_L3003-003 и 005), 7,2 пмоль UPM-Mix (UPM-Mix: 2 мкМ ShortUPMH3 и 0,4 мкМ LongUPMH3), 0,6 мкл 5'RACE кДНК матрицы, и 1,5 единицы ДНК полимеразы PfuTurbo(R) Hotstart в буфере для ПЦР реакции (поставляемом с полимеразой) в общем объеме 30 мкл. ПЦР реакции проводят в аппарате TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Germany; product 050-801), применяя программу из 35 циклов: денатурация при 95°C в течение 2 мин; 35 циклов из 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 1,5 мин; конечное наращивание при 72°C в течение 10 мин. Если требуется, ПЦР смеси хранят при 4°C до следующего анализа или обработки.

Таблица 5

Праймеры

название	последовательность
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
RACEV _L BsiWi	GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG
RACEV _H ApaI	GGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTT
RACEG1A1	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
M13reverse	GGATAACAATTTTCACACAGG
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT
HCseq5	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
VH3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGT

	TCCTC
VH3003-5for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT
VL3003-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC
VL3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTG
VH300324exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCC
VL3003-24-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC

Клонирование -003-2F5 V_H и V_L и -005 V_L и -024 V_H и V_L в pGEMT-вектор системы II.

Продукты реакции разделяют с помощью электрофореза на 1% TAE агарозном геле и окрашивают с помощью этидий бромид. Полосы правильного размера вырезают из геля и выделяют ДНК из агарозы с помощью набора для экстракции Qiaexll gel extraction kit (Qiagen, cat no 20021).

К выделенным из геля ПЦР фрагментам добавляют концевые А посредством инкубации в течение 10 мин при 72°C с 200 мкМ дАТФ и 2,5 ед. Amplitaq (Perkin Elmer) и очищают с помощью колонок для миниэлюции (Qiagen). ПЦР фрагменты с концевыми А клонируют в вектор pGEMTeasy (Promega), применяя набор pGEMT easy vector system II kit и протокол (LJ270, page 3/4). 2 мкл смеси после лигирования трансформируют в компетентные клетки E.coli OneShot DH5[alpha]T1R (Invitrogen) и засевают на чашках со средой LB/ ампициллин/IPTG/Xhal.

Секвенирование.

V -участки -003 и -024 и -005 V_L участок секвенируют с помощью AGOWA (Berlin, Germany) после захвата, соответственно, 20 (V_H -003), 16 (V_L -003), 15 (V_L -005) и 6 (V_H и V_L -024) белых колоний, выделения плазмид и секвенирования с обратным праймером M13. V_H участок секвенируют прямо с ПЦР продуктом, применяя праймер HCseq5. Последовательности секвенируют с применением системы Vector NTI advanced suite (Invitrogen).

Получение экспрессирующих векторов для антител -003, -005, -024 и Morphosys антитела 3079.

Участок, кодирующий V_H -003 амплифицируют с помощью ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H участок -003, применяя праймеры VH3003-003for и RACEVHApaI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 (Lonza Biologies, Slough, UK) и идеальную последовательность Kozak (GCCGCCACC). Вектор pConG1f0.4 содержит константный участок тяжелой цепи человеческого IgG1. V_H ПЦР фрагмент вставляют в рамке считывания в pConG1f0.4, применяя HindIII и ApaI. Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_H -005 амплифицируют с помощью ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H участок -005, применяя праймеры VH3003-5for и RACEVHApaI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. V_H ПЦР фрагмент вставляют в рамке считывания в вектор pConG1f0.4, применяя HindIII и ApaI. Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_H -024, амплифицируют с помощью ПЦР из клона плазмиды pGemT, содержащего V_H участок -024, применяя праймеры VH300324exfor и RACEVHApaI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. V_H ПЦР фрагмент вставляют в рамке считывания в вектор pConG1f0.4, применяя HindIII и ApaI. Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_H Morphosys антитела 3079, синтезируют с помощью GeneArt (Regensburg, Germany), основываясь на данных, опубликованных в патенте WO 2005/103083 A2. Кодирующий участок оптимизируют по кодонам для экспрессии в НЕК клетках для усиления уровней экспрессии и вводят нужные участки рестрикции (HindIII и ApaI) для клонирования в pConG1f0.4 и идеальную последовательность Козака. Плазмиду, содержащую синтетический V_H участок, обрабатывают ApaI и HindIII и V_H фрагмент вставляют в рамке считывания в вектор pConG1f0.4.

Участок, кодирующий V_L -005, амплифицируют с помощью ПЦР на клоне плазмиды pGemT, содержащей V_L участок -005, применяя праймеры VL3003-5exfor и RACEVLBsiWI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 (Lonza Biologies) и идеальную последовательность Козака. Вектор pConKappa0.4 содержит константный участок каппа легкой цепи. V_L ПЦР фрагмент вводят в рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II. Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_L -003, амплифицируют с помощью ПЦР на клоне плазмиды pGemT, содержащей V_L участок -003, применяя праймеры VL3003-003for и RACEVLBsiWI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. V_L ПЦР фрагмент вводят в рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II.

Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_L -024, амплифицируют с помощью ПЦР на клоне плазмиды pGemT, содержащей V_L участок -024, применяя праймеры VL3003-24-5exfor и RACEVLBSiWI, вводящие нужные участки рестрикции (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. V_L ПЦР фрагмент вводят в рамке считывания в вектор pConKappa0.4 с помощью HindIII и Pfl23II. Конструкцию проверяют с помощью анализа последовательности.

Участок, кодирующий V_L Morphosys антитела 3079, синтезируют с помощью GeneArt, основываясь на данных, опубликованных в WO 2005/103083. Кодирующий участок оптимизируют по кодонам для экспрессии в НЕК клетках для усиления уровней экспрессии и вводят нужные участки рестрикции (HindIII и Pfl23II) для клонирования в pConKappa0.4 и идеальную последовательность Козака. Плазмиду, содержащую синтетический V_L участок, обрабатывают Pfl23II и HindIII и V_H фрагмент вставляют в рамке считывания в вектор pConKappa0.4.

Антитела временно экспрессируют в клетках НЕК-293F, как описано в примере 17, с помощью ко-трансфекции их векторов тяжелой и легкой цепей.

Получение устойчивых клеточных линий в CHO-K1SV клетках.

Для получения устойчивых клеточных линий векторы тяжелой и легкой цепей -003 и -005 комбинируют в одном векторе с двумя генами с помощью стандартных техник клонирования. Векторы с двойными генами -003 и -005 линеаризуют и трансфицируют в клетки CHO-K1SV (Lonza Biologies), по существу, как описано производителем. Устойчивые клеточные линии отбирают с помощью селекции с 25 мкМ L-Метионин-сульфомиксина (MSX), как описано в Lonza Biologies. Клоны с наибольшей продуктивностью отбирают и размножают в среде CD-CHO (Invitrogen) и антитела очищают из клеточного супернатанта, как описано в примере 3.

Пример 17. Картирование эпитопа с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Олигонуклеотидные праймеры синтезируют и количество их оценивают с помощью Isogen Bioscience (Maarssen, The Netherlands). Праймеры растворяют в воде в концентрации 100 пмоль/мкл и хранят при -20°C . Все ПЦР праймеры и праймеры для секвенирования приведены в табл. 6. Для ПЦР применяют ДНК полимеразу PfuTurbo(R) Hotstart (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands; product #600322) согласно инструкции производителя. Каждая реакционная смесь содержит 200 мкМ смешанных дНТФ (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands), 10 пмоль прямого и обратного праймера, 100 нг геномной ДНК или 1 нг ДНК плазмиды и 1 единицу ДНК полимеразы PfuTurbo® Hotstart в буфере для ПЦР реакции (поставляемом с полимеразой) в общем объеме 20 мкл. ПЦР реакции проводят в аппарате TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Germany; product 050-801), применяя программу на 32 циклов: денатурации при 95°C в течение 2 мин; 30 циклов из 95°C в течение 30 с, градиент $60-70^{\circ}\text{C}$ (или другая специфическая температура прилегания) в течение 30 с и 72°C в течение 3 мин; конечное наращивание при 72°C в течение 10 мин. Если требуется, ПЦР смеси хранят при 4°C до следующего анализа или обработки.

Электрофорез в агарозном геле проводят по Самбруку (Sambrook, Russell et al. 2000), применяя гели из 50 мл на 1X Трис-ацетат-ЭДТА буфер. ДНК определяют с помощью включения в гель этидий бромиды и наблюдения в УФ-свете. Изображения гелей записывают с помощью CCD камеры и системы анализа изображений (GeneGnome; Syngene, via Westburg B.V., Leusden, The Netherlands).

Очистку нужных фрагментов ПЦР проводят с помощью набора MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, via Westburg, Leusden, The Netherlands; product 28006) по инструкции производителя. Выделенные ДНК количественно оценивают с помощью УФ-спектроскопии (см. ниже) и анализируют качество с помощью электрофореза в агарозном геле.

Альтернативно продукты ПЦР или переваривания разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле (например, когда присутствуют множественные фрагменты), применяя 1% Трис-ацетат-ЭДТА агарозный гель. Нужный фрагмент иссекают из геля и выделяют ДНК с помощью набора QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen; product# 20051) по инструкции производителя.

Оптическую плотность нуклеиновых кислот определяют с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands) по инструкции производителя. Концентрацию ДНК определяют с помощью анализа оптической плотности (OD) при 260 нм (1 единица $\text{OD}_{260}=50 \text{ мкг/мл}$). Для всех образцов в качестве сравнения применяют буфер, в котором растворены нуклеиновые кислоты.

Ферменты рестрикции и дополнительные вещества получены от New England Biolabs (Beverly, MA, USA) или Fermetas (Vilnius, Lithuania) и применяются согласно инструкциям поставщиков. ДНК (100 нг) обрабатывают 5 ед. фермента(ов) в подходящем буфере в конечном объеме 10 мкл (объем реакции увеличивают в нужное количество раз, если требуется). Обработку (переваривание) проводят при рекомендуемой температуре в течение не менее 60 мин. В случае фрагментов, требующих двойного переваривания рестриктазами, которые предъявляют несовместимые требования к буферам или температурам, обработки проводят последовательно. При необходимости продукты переваривания очищают с помощью электрофореза в агарозном геле и экстракции из геля.

Лигирование фрагментов ДНК проводят с помощью Quick Ligation Kit (New England Biolabs) согласно инструкциям поставщика. Для каждого лигирования ДНК вектора смешивают с приблизительно трех-

кратным избытком ДНК вставки.

Плазмидную ДНК (1-5 мкл раствора ДНК, обычно, 2 мкл смеси ДНК после лигирования) трансформируют в клетках One Shot DH5 α -T1® E. coli (Invitrogen, Breda, The Netherlands; product 12297-016) с применением способа теплового шока согласно инструкциям поставщика. Далее клетки засевают на чашках с агаризованной средой Лурия-Бертани (LB), содержащих 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубируют в течение 16-18 ч при 37°C, пока колонии бактерий не станут заметными.

Бактериальные колонии подвергают скринингу на присутствие векторов, содержащих нужные последовательности, с помощью ПЦР колоний с применением смеси для ПЦР ThermoStart PCR Master Mix (Abgene, via Wetsburg, Leusden, The Netherlands; product* AB-938-DC15/b) и праймеров pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2 (табл. 6). Отобранных колоний слегка касаются наконечником для пипетки на 20 мкл и быстро касаются им же 2 мл LB для малых культур и затем суспендируют в смеси для ПЦР. ПЦР проводят в аппарате TGradient Thermocycler 96 с применением программы на 35 циклов: денатурации при 95°C в течение 15 мин; 35 циклов из 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 2 мин; с последующим этапом конечного наращивания в течение 10 мин при 72°C. Если требуется, ПЦР смеси хранят при 4°C до следующего анализа или обработки.

Плазмидную ДНК выделяют из культур E. coli с помощью следующих наборов от Qiagen (via Westburg, Leusden, The Netherlands) согласно инструкциям поставщика. Для получения больших препаратов плазмид (из 50-150 мл культуры) применяют HiSpeed Plasmid Maxi Kit (product 12663) или HiSpeed Plasmid Midi Kit (product 12643). Для получения небольших количеств плазмид (около 2 мл культуры) применяют Qiaprep Spin Miniprep Kit (product 27106) и ДНК элюируют в 50 мкл буфера для элюции (предоставленного в наборе).

Конструкция экспрессирующего HA-CD38 вектора pEE13.4HACD38.

Внеклеточный домен CD38 человека амплифицируют с плазмиды pClpuroCD38 (полученной от Prof. M. Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK) с помощью праймеров cd38forha и cd38exrev. Посредством этой ПЦР реакции вводят HA-таг. Такой продукт ПЦР применяют в качестве матрицы для второй реакции ПЦР с праймерами SPHMM38ex и cd38exrev. Посредством этой реакции ПЦР вводят сигнальный пептид SPHMM, участки рестрикции и идеальную последовательность Козака (GCCGCCACC) для оптимальной экспрессии. После очистки такой продукт ПЦР клонируют в экспрессирующий вектор pEE13.4 (Lonza Biologies) и полную кодирующую последовательность подтверждают с помощью секвенирования с праймерами pConKseq1, pEE13.4seqrev, cd38seq1for и cd38seq2rev (табл. 6). Эту конструкцию называют pEE13.4HACD38.

Сайт-направленный мутагенез.

Конструируют три одиночные мутантные белка из huCD38 у которых T мутирован в A в положении 237 (T237A, SEQ ID NO:3 2), Q мутирован в R в положении 272 (Q272R, SEQ ID NO: 33), или S мутирован в F в положении 274 (S274F, SEQ ID NO: 34). Сайт-направленный мутагенез проводят с помощью набора QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) согласно инструкциям поставщика. Этот способ включает введение дополнительного молчащего участка рестрикции для скрининга успешных мутантов (дополнительный XbaI участок для T237A мутанта, дополнительный BclI участок для Q272R мутанта и потеря SspI участка для S274F мутанта). Вкратце, 5 мкл 10 $\times$ реакционного буфера, 1 мкл олигонуклеотида HACD38T237Afor2, HACD38Q272Rfor или HACD38S274Ffor (100 пмоль/мкл), 1 мкл олигонуклеотида HACD38T237Arev2, HACD38Q272Rrev или HACD38S274Frev (100 пмоль/мкл), 1 мкл смеси дНТФ, 3 мкл Quicksolution, 1 мкл плазмиды pEE13.4HACD38 (50 нг/мкл) и 1 мкл ДНК полимеразы PfuUltra HF DNA смешивают в конечном объеме 50 мкл и амплифицируют в аппарате TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Germany; product 050-801) с применением программы из 18 циклов: денатурации при 95°C в течение 1 мин; 18 циклов из 95°C в течение 50 с, 60°C в течение 50 с и 68°C в течение 10 мин. ПЦР смеси хранят при 4°C до последующего применения. Далее смеси ПЦР инкубируют с 1 мкл DpnI for в течение 60 мин при 37°C для переваривания вектора pEE13.4HACD38 дикого типа и хранят при 4°C до последующего применения. ДНК из реакционной смеси осаждают с помощью 5 мкл ацетата натрия и 125 мкл этанола, инкубируют в течение 20 мин при -20°C и собирают центрифугированием в течение 20 мин при 4°C при 14000 об/мин. Осадок ДНК промывают 70% этанолом, сушат и растворяют в 4 мкл воды. 4 мкл объема реакции целиком трансформируют в компетентные клетки One Shot Top 10DH5 α T1® E. coli (Invitrogen, Breda, The Netherlands) согласно инструкциям поставщика (Invitrogen). Далее клетки засевают на чашках с агаризованной средой Лурия-Бертани (LB), содержащих 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубируют в течение 16-18 ч при 37°C, пока колонии бактерий не станут заметными.

Колонии подвергают скринингу с помощью ПЦР колоний, применяя праймеры pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2 (табл. 5) и обрабатывают соответствующими ферментами рестрикции для скрининга на включение мутагенного олигонуклеотида. Два положительных клона для каждого мутанта выращивают и выделяют плазмидную ДНК. Полную HACD38-кодирующую нуклеотидную последовательность определяют с помощью праймеров cd38seq1for, pConG1seq1 и pEE13.4seqrev2, чтобы подтвердить присутствие мутаций и отсутствие дополнительных нежелательных мутаций.

Секвенирование ДНК.

Образцы плазмидной ДНК посылают в AGOWA (Berlin, Germany) для анализа последовательностей. Последовательности анализируют с помощью современной программы Vector NTI (Informax, Oxford, UK).

Временная экспрессия в клетках НЕК-293F.

Клетки FreestyleTM 293-F (субклон HEK-293, приспособленный к росту в суспензии и в химически определенной среде Freestyle, (HEK-293F)) получают из Invitrogen и трансфицируют pEE13.4HACD38 и тремя конструкциями, несущими мутации T237A, Q272R и S274F, согласно протоколу поставщика с применением 293 фектина (Invitrogen). Клеточные супернатанты от трансфицированных клеток применяют в ELISA для исследования связывания анти-CD38.

Связывание анти-CD38 антител.

Планшеты для ELISA (Greiner, # 655092) покрывают в течение ночи при 4°C 1 мкг анти-НА антитела (Sigma, # Н-9658) и далее блокируют с помощью 2% сыворотки бычьей плазмы. Культуральные супернатанты от трансфицированных клеток HEK293F разводят, наносят на планшеты для ELISA и инкубируют в течение 1 ч при комн.темп. После промывки добавляют серийные разведения NuMabs -003 и -005 и инкубируют в течение 1 ч при комн.темп. Связанные антитела детектируют с помощью HRP-конъюгированных козьих античеловеческих IgG антител. Анализ проявляют с помощью ABTS (Roche, # 1112597) и оптическое поглощение измеряют при 405 нм с помощью спектрофотометра.

Как можно видеть на фиг. 23А-23В, как -003, так и -005 связываются с диким типом CD38 человека. На связывание -003 не влияет введение мутаций T237A (фигура 23А), Q272R (фиг. 23Б) или S274F (фиг. 23В). -005 способен связывать CD38, несущее мутацию T237A (фиг. 23А). Связывание -005 с CD38 с мутацией Q272R серьезно изменено (фиг. 23Б) как с точки зрения EC_{50} так и максимальной емкости связывания. -005 не способен связываться с мутантом CD38, у которого серин в положении 274 замещен фенилаланином (фиг. 23В).

Эти данные показывают, что -003 и -005 связываются с разными эпитопами. Далее эти исследования выявляют, что связывание -005 с CD38 является чувствительным к мутациям по положениям 272 и 274. В особенности S274 важен для связывания -005 с CD38.

Таблица 6

название	последовательность
cd38forha	CTGCTGTGGCCCCATGGTGTGGGCCTACCCCTACGACG TGCCTGACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC
cd38exrev	AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG
SPHMM38ex	TATAGCCCCGGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTG GTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTGGCCATG GTGTGGGCC
pConG1seq1	GAAGACTTAAAGCAGCGGCAGAA
pConKseq1	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pEE13.4seqrev	TGCATTCATTTTATGTTTCAGGT
pEE13.4seqrev2	TCGGACATCTCATGACATTTCTTT
cd38seq1for	AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT
cd38seq2rev	GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG
HACD38T237Arev2	TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACC TTCTCTGGTTG
HACD38T237Afor2	CAACCAGAGAAGGTTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTG ATACATGGTGGA
HACD38Q272Rrev	GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTT AT
HACD38Q272Rfor	ATAAGCAAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATA TC
HACD38S274Frev	TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAAATTGAATGTTCCTT TTGCTTATA
HACD38S274Ffor	TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTTCTGCAAGAAT ATCTACAGA

Пример 18. Индукция пролиферации РВМС.

-003, -005 и -024 тестируют в анализе, по существу, как описано в Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, PBMC от здоровых доноров культивируют при концентрации 1×10^5 клеток/ячейку на плоскодонных платах на 96 ячеек в присутствии антител (конечные концентрации: 1, 1-3, 3-10-30 мкг/мл) в 200 мкл RPMI⁺. Стимуляцию клеток IL-15 (при 333 нг/мл; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) применяют как положительный контроль. Через 4 дня инкубации при 37°C добавляют 30 мкл ³H-тимидина (16,7 мКи/мл) и культивирование продолжают в течение ночи. Включение ³H-тимидина анализируют с помощью γ-счетчика Packard Cobra gamma counter (Packard Instruments, Meriden, DT, USA) согласно инструкциям поставщика. Данные показаны в виде средних значений счета в cpm (±SEM) PBMC, полученного от 10 доноров. Результаты показывают, что -003 и -005 не индуцируют значительной пролиферации PBMC (фиг. 24А). Также -024 не индуцирует значительной пролиферации PBMC (данные не приведены).

Пример 19. Индукция IL-6.

-003, -005 и -024 тестируют в анализе, как описано в Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, PMBC культивируют при концентрации 1×10^6 клеток/ячейку на платах на 48 ячеек в присутствии 20 мкг/мл антител и 10 нг/мл LPS (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, The Netherlands) в 500 мкл RPMI⁺⁺. После инкубации в течение ночи при 37°C супернатант собирают и хранят при -20°C. Концентрацию IL-6 определяют с помощью ELISA (IL-6 ELISA kit, U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands) согласно инструкциям поставщика. Данные представляют средние концентрации с пг/мл ($\pm$ SEM) от 7 доноров. Результаты показывают, что -003 и -005 не индуцируют высвобождение значительных уровней IL-6 (фиг. 24Б). Также -024 не индуцирует высвобождение значительных уровней IL-6 (данные не приведены).

Пример 20. Индукция высвобождения IFN- γ .

-003, -005 и -024 тестируют в анализе, как описано в Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). Вкратце, PMBC от здоровых доноров культивируют при концентрации 1×10^5 клеток/ячейку на платах на 48 ячеек в присутствии 20 мкг/мл антител и 1 мкг/мл ОКТ-3 (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) в 500 мкл RPMI⁺⁺. После инкубации в течение ночи при 37°C супернатант собирают и хранят при -20°C. Концентрацию IFN- γ определяют с помощью ELISA (IFN- γ ELISA kit, U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands) согласно инструкциям поставщика. Данные представляют средние концентрации с пг/мл ($\pm$ SEM) от 9 доноров. Результаты показывают, что -003 и -005 не индуцируют высвобождение детектируемых уровней IFN- γ (фиг. 24Б). Также -024 не индуцирует высвобождение значительных уровней IFN- γ (данные не приведены).

Пример 21. Сродство связывания -003 и -005 с рекомбинантным CD38.

Связывание -003 и -005 с CD38 тестируют с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Вкратце, очищенные антитела иммобилизуют на сенсорных чипах CM-5 sensor chip (Biacore, Uppsala, Sweden) через аминную связь. CD38 с НА-тагом (см. пример 3) протекают над чипом и связывание антигена с mAb детектируют по изменению показателя преломления на поверхности чипа с помощью установки Biacore 3000 (Biacore). Константы ассоциации и скорости для -003 (табл. 7) и -005 (табл. 8) суммированы ниже (среднее по трем экспериментам $\pm$ CD) и показывают, что -003 и -005 обладают высоким сродством к CD38.

Таблица 7

Константы ассоциации и скорости при 25°C для -003

-003

k_a (1/Mc)	$2,17 \times 10^5 \pm 2,65 \times 10^4$
k_d (1/c)	$1,9 \times 10^{-4} \pm 4,51 \times 10^{-6}$
K_A (1/M)	$1,14 \times 10^9 \pm 1,58 \times 10^8$
K_D (M)	$8,85 \times 10^{-10} \pm 1,2 \times 10^{-10}$

Таблица 8

Константы ассоциации и скорости при 25°C для -005

-005

k_a (1/Mc)	$8,88 \times 10^4 \pm 1,95 \times 10^4$
k_d (1/c)	$5,22 \times 10^{-4} \pm 1,16 \times 10^{-5}$
K_A (1/M)	$1,7 \times 10^8 \pm 3,68 \times 10^7$
K_D (M)	$6,06 \times 10^{-9} \pm 1,21 \times 10^{-9}$

Пример 22. Картирование эпитопа.

Картирование эпитопа с помощью подхода PEPSCAN.

Согласно известным процедурам (Geysen et al. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc Natl Acad Sci USA 81:3998; Slootstra et al. 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. Mol Divers 1:87; Puijk et al. 2001. Segment synthesis. In PCT, The Netherlands, p.l.) перекрывающиеся 20-мерные линейные и 15-мерные петлевые пептиды синтезируют, охватывая 138 аминокислот на С-конце CD38 человека. Далее, основываясь на последовательности С-конца, делают однопетлевые пептиды различного размера, покрывающие участок KNIYRDPKFLQCVKNPEDSSCTSEI, участок CVHNLQPEKVQTLEAWVIHGG и участок CLESIISKRNIQFSAKNIYRC. Дополнительно созданы дополнительные наборы для реконструкции участков с двойными петлями, которые состоят из SKRNIQFSCKNIYR и EKVQTLEAWVIHGG. Природные цистеины заменены на аланины. Пептиды подвергнуты скринингу с помощью анализа ELISA с применением карт mini-PEPSCAN размером с кредитную карту.

Синтез пептидов.

Пептиды синтезируют с помощью стандартной химии Fmoc и защиту снимают с применением TFA с поглотителями. Далее пептиды со снятой защитой подвергают реакции с микроматрицей с 0,5 мМ раствором 2,6-бис(бромметил)пиридина или 2,4,6-трис(бромметил)мезитилена в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,9), дополненной ацетонитрилом (1:1 об./об.). Микроматрицы осторожно встряхивают в раство-

ре в течение 30-60 мин при полном покрытии раствором. Под конец микроматрицы промывают большим количеством воды из Millipore и озвучивают в буфере для разрушения, содержащем 1% додецилсульфат натрия, 0,1% (3-меркаптоэтанол в PBS (pH 7,2) при 70°C в течение 30 мин с последующим озвучиванием в воде из Millipore в течение еще 45 мин.

Анализ PEPSCAN ELISA.

Полиэтиленовую карту на 445 ячеек размера кредитной карты, содержащую ковалентно-связанные пептиды, инкубируют с сывороткой (например, разведенной 1:1000 блокирующим раствором, который содержит 5% лошадиную сыворотку (об./об.) и 5% овальбумин (вес./об.) (4°C в течение ночи). После промывки пептиды инкубируют с кроличьим античеловеческим Ig, связанным с пероксидазой (разведение 1:1000, 25°C, 1 ч), и после промывки добавляют субстрат пероксидазы (2,2-азиноди-3-этилбензилтиазолин сульфатом и 2 мкл/мл 3% H₂O₂). Через 1 ч развитие окраски измеряют с помощью CCD камеры и системы обработки изображений. Установка состоит из CCD камеры с 55 мм линзами (Sony CCD Video Camera XC-77RR, объектив Nikon micro-nikkor 55 mm 172.8), адаптера камеры (Sony Camera adaptor DC-77RR) и программы Image Processing Software package Optimas, version 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.; Optimas работает на компьютере pentium II).

Способ презентации эпитопа.

Индивидуальные аминокислоты идентифицируют по дипептидным мотивам, которые представляют наименьшие уникальные единицы в аминокислотной последовательности CD38 человека. Всем дипептидным мотивам, присутствующим в каждом из 1164 тестируемых пептидов, придаются ELISA значения, полученные для соответствующего полного пептида. Чтобы выстроить ряд дипептидных мотивов от сильного до слабого связывания, рассчитывают относительный сигнал посредством деления ELISA значений, полученных для каждого индивидуального мотива, на усредненные ELISA значения от всех 1164 линейных и петлевых пептидов и их сортируют по уменьшению величин. Таким образом, определяют вклады аминокислот в конформационные эпитопы. Для каждого тестируемого mAb отбирают все дипептидные мотивы, получившие выше 2,5 балла (например, ELISA значения пептидов, содержащих эти мотивы по меньшей мере в 2,5 раза больше усредненной ELISA величины, полученной со всеми 1164 пептидами). Данные разлагают на вклады одиночных аминокислот, представленные в линейной последовательности CD38 с помощью системы баллов. Перемещаясь вдоль линейной последовательности CD38 и применяя уникальные дипептидные единицы в качестве точки отсчета, придают один балл каждый раз, когда аминокислота CD38 присутствует в этом наборе пептидов с высокими баллами.

Обнаружено, что -003, -005 и -024 связываются с участком SKRNIQFSCKNYR и EKVQTLEAWVINGG в CD38 человека. -003 в особенности узнает мотивы RNIQF и WVIN, -005 в особенности узнает мотивы KRN и VQTL.

Пример 23. Ферментативная активность.

Ферментативную активность CD38 человека измеряют в анализе, по существу, как описано в Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Вкратце, субстрат NGD⁺ (80 мкМ) инкубируют с CD38 (0,6 мкг/мл внеклеточного домена CD38 с Гис-тагом, см. пример 3 относительно очистки His-CD38) в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7.0. Продукцию цГДФР можно наблюдать спектрофотометрически с длиной волн эмиссии 410 нм (возбуждение при 300 нм). В этом примере применяют фильтр на возбуждении 340±60 нм и фильтр на эмиссии 430±8 нм.

Чтобы тестировать действие -003, -005 и -024 на ферментативную активность CD38, рекомбинантный белок His-CD38 рпе-инкубируют в течение 15 мин при комн.темп. с различными концентрациями (30, 3, 0,3 и 0,03 мкг/мл) различных антител перед добавлением субстрата NGD⁺. Продукцию циклической ГДФ-рибозы (цГДФР) регистрируют в различные моменты времени после добавления антител (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 75 и 90 мин).

Фиг. 26Б показывает, что -005 обладает значительным ингибиторным действием на продукцию цГДФР. Через 90 мин добавление 30 и 3 мкг/мл -005 приводит к уменьшению на 32% и 34% продукции цГДФР (табл. 9). Сходные результаты наблюдаются в независимых экспериментах с применением разных партий -005.

Никакого ингибиторного действия на продукцию цГДФР не наблюдается после добавки -003 (фиг. 25Б, табл. 9), -024 (фиг. 25Г, табл. 9) или анти-KLN (фиг. 25А, табл. 9).

На основании этих данных ожидается, что -005 также ингибирует синтез циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из НАД⁺. Ингибирование синтеза цАДФР можно определять согласно способу ВЭЖХ, описанному в Munshi et al., J. Biol. Chem. 275. 21566-21571 (2000).

Таблица 9

Продукция цГДФ-рибозы в присутствии CD38-специфических антител или анти-KLH

	продукция (% NGD контроля)			
	30 мкг/мл	3 мкг/мл	0,3 мкг/мл	0,03 мкг/мл
KLH	110	99	108	111
-003	99	100	107	107
-005	68	66	98	102
-024	99	100	104	105

Пример 24. Сравнение -003 и -005 с Morphosys антителом 3079.

Антитела -003 и -005 функционально сравнивают с Morphosys антителом 3079 (ТН-3079). Способы клонирования и экспрессии Morphosys антитела 3079 описаны в примере 16. Способы проведения CDC описаны в примере 6. Способы проведения ADCC описаны в примере 5. Фиг. 26А показывает, что -003 и -005 и ТН-3079 индуцируют CDC-опосредованный лизис трансфицированных CD38-CHO клеток со сходными значениями максимального лизиса. При сравнении величин EC_{50} -005 антитело оказывается лучше, чем ТН3079, в индукции лизиса CD38-CHO клеток, причем EC_{50} в два раза ниже (см. табл. 10).

Фиг. 26Б показывает, что -005 превосходит ТН-3079 в индукции CDC-опосредованного лизиса Daudi-luc клеток, причем максимальный лизис с помощью -005 в 2-3 раза выше, чем с помощью ТН-3079. При сравнении величин EC_{50} антитела -005 сходны с ТН-3079 в индукции лизиса Daudi-luc клеток (см. табл. 10). -003 не индуцируют значительного CDC-опосредованного лизиса Daudi-luc клеток.

Фиг. 26В показывает, что в этом эксперименте -005, -003 и ТН-3079 опосредуют лизис Daudi клеток мишеней через ADCC. Никакой разницы не обнаружено в значениях логарифма EC_{50} и максимального лизиса (табл. 11, n=5).

Таблица 10

Максимальный лизис и значения EC_{50} для CD38-специфических антител в реакции CDC

	CHO-CD38 клетки (n=2)		Daudi-luc клетки (n=2)	
	EC_{50} мкг/мл	% Макс. лизиса	EC_{50} мкг/мл	% Макс. лизиса
-005	$0,15 \pm 0,007$	$76,5 \pm 3,54$	$0,39 \pm 0,00$	$70,5 \pm 7,78$
ТН-3079	$0,31 \pm 0,021$	$81,5 \pm 7,78$	$0,34 \pm 0,26$	$25,5 \pm 12,02$
-003	$4,5 \pm 0,933$	$62,0 \pm 16,79$	nc	$12 \pm 8,49$

Таблица 11

Максимальный лизис и значения EC_{50} для CD38-специфических антител в реакции CDC

	Log EC_{50}	STD log EC_{50}	Макс. лизис (%)	STD макс. лизиса
-005	0,76	0,18	49,2	12,8
-003	1,17	0,23	64	14,2
ТН3079	0,96	0,10	43,8	12,0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывается с CD38 человека, причем указанное антитело содержит переменные области легкой цепи человека и тяжелой цепи человека, причем переменная область легкой цепи содержит CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 15, а переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 18, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 19 и CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 20.

2. Моноклональное антитело по п.1, отличающееся тем, что представляет собой полноразмерное антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM.

3. Моноклональное антитело по п.2, представляющее собой антитело IgG1.

4. Моноклональное антитело по п.3, представляющее собой антитело IgG1, к.

5. Моноклональное антитело по п.2, представляющее собой антитело IgM.

6. Моноклональное антитело по п.5, представляющее собой антитело IgM, к.

7. Моноклональное антитело по любому из пп.1-6, содержащее область VH с последовательностью SEQ ID NO: 17.

8. Моноклональное антитело по любому из пп.1-6, содержащее область VH, содержащую аминокислотную последовательность, охватывающую VH CDR1-VH CDR3 сегмент SEQ ID NO: 17.

9. Моноклональное антитело по любому из пп.1-8, содержащее область VL с последовательностью SEQ ID NO: 12.

10. Моноклональное антитело по любому из пп.1-9, содержащее область VL с последовательностью SEQ ID NO: 12 и область VH с последовательностью SEQ ID NO: 17.

11. Моноклональное антитело по любому из пп.1-10, которое не связывается с моноклеарными

клетками периферической крови макака циномолгус, как определено методом проточной цитометрии согласно способу, описанному в примере 11 описания.

12. Моноклональное антитело по любому из пп.1-11, которое не связывается с моноклеарными клетками периферической крови макака-резуса, как определено методом проточной цитометрии согласно способу, описанному в примере 11 описания.

13. Моноклональное антитело по любому из пп.1-12, которое не связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

14. Моноклональное антитело по п.13, отличающееся тем, что EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток серина в положении 274 замещен остатком фенилаланина (SEQ ID NO: 34), составляет менее 50%, например менее 10%, менее 5% или менее 1% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

15. Моноклональное антитело по любому из пп.1-14, которое не связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток глутамин в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

16. Моноклональное антитело по п.15, отличающееся тем, что EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток глутамин в положении 272 замещен остатком аргинина (SEQ ID NO: 33), составляет менее 50%, например менее 10%, менее 5% или менее 1% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

17. Моноклональное антитело по любому из п.1-16, которое связывается с мутантным CD38 человека, в котором остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), в той же степени, в какой оно связывается с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

18. Моноклональное антитело по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что EC_{50} для связывания антитела с мутантным CD38 человека, в котором остаток треонина в положении 237 замещен остатком аланина (SEQ ID NO: 32), соответствует 75-125% величины EC_{50} для связывания антитела с CD38 человека дикого типа (SEQ ID NO: 31).

19. Моноклональное антитело по любому из пп.14, 16 или 18, отличающееся тем, что EC_{50} определяют с помощью ELISA, как описано в примере 17 описания.

20. Моноклональное антитело по любому из предшествующих пунктов, которое специфически связывается с участком SKRNIQFSCKNLYR и участком EKVQTLEAWVIHGG в CD38 человека (SEQ ID NO: 31).

21. Моноклональное антитело по любому из предыдущих пунктов, которое обладает одной или более из следующих характеристик:

- (1) действует как антагонист CD38;
- (2) не индуцирует значительную пролиферацию моноклеарных клеток периферической крови, как определяют способом, раскрытым в примере 18 описания;
- (3) не индуцирует высвобождение значительного количества IL-6 моноцитами человека или моноклеарными клетками периферической крови, как определяют способом, раскрытым в примере 19 описания;
- (4) не индуцирует высвобождение детектируемого количества IFN- γ Т-клетками человека или моноклеарными клетками периферической крови человека, как определяют способом, раскрытым в примере 20 описания;
- (5) интернализуется клетками, экспрессирующими CD38; например интернализуется клетками CHO-CD38 в течение 5-15 мин при 37°C, как определяют способом, раскрытым в примере 12 описания;
- (6) индуцирует ADCC; например, со значением EC_{50} ниже 15 нг/мл, например ниже 10 нг/мл в клетках Daudi-luc и со значением EC_{50} ниже 75 нг/мл, например ниже 50 нг/мл, 30 нг/мл или 10 нг/мл в клетках MM, как определяют способом, раскрытым в примере 5 описания;
- (7) индуцирует CDC в присутствии комплемента, например, со значением EC_{50} ниже 5 мкг/мл, например ниже 1 мкг/мл в клетках Daudi-luc или CHO-CD38, как определяют способом, раскрытым в примере 6 описания;
- (8) ингибирует синтез цГДФР;
- (9) ингибирует синтез цАДФР;
- (10) связывается с CD38 человека с аффинностью (K_D) ниже 10^{-8} М, например в интервале от 10^{-8} до 10^{-11} М, например в интервале от 7×10^{-9} до 10^{-10} М, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса согласно примеру 20 описания.

22. Моноклональное антитело по п.21, которое ингибирует синтез цГДФР по меньшей мере на 25%, например на 30% через 90 мин в концентрации 3 мкг/мл, как определяют с помощью спектрофотометрического способа согласно примеру 24 описания.

23. Моноклональное антитело по п.21, которое ингибирует синтез цАДФР по меньшей мере на 25%, например на 30% через 90 мин в концентрации 3 мкг/мл, как определяют с помощью ВЭЖХ.

24. Моноклональное антитело по любому из пп.1-23, которое подвергается гликозилированию в зу-

кариотической клетке.

25. Моноклональное антитело по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащее хелатирующий линкер для присоединения радиоизотопа.

26. Иммуноконъюгат, содержащий моноклональное антитело по любому из пп.1-25, связанное с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарственным средством.

27. Иммуноконъюгат, содержащий моноклональное антитело по любому из пп.1-25, где антитело является мономерным антителом IgM, связанным с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарственным средством.

28. Биспецифичная или мультиспецифичная молекула, содержащая моноклональное антитело по любому из пп.1-24 и обладающая специфичностью связывания в отношении эффекторной клетки человека.

29. Биспецифичная или мультиспецифичная молекула, содержащая моноклональное антитело по любому из пп.1-24 и обладающая специфичностью связывания в отношении CD3, CD4, CD138, IL-15R, мембрано-связанного или связанного с рецептором TNF- α , человеческого Fc рецептора или мембрано-связанного или связанного с рецептором IL-15.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело по любому из пп.1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, содержащая один или более дополнительных терапевтических агентов.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из пп.26 и 27 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, содержащая один или более дополнительных терапевтических агентов.

34. Способ ингибирования роста и/или пролиферации клеток, экспрессирующих CD38, включающий введение моноклонального антитела по любому из пп.1-25, иммуноконъюгата по п.26 или 27 или фармацевтической композиции по любому из пп.30-33.

35. Способ лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессирующими CD38 клетками, у субъекта, причем указанный способ включает введение моноклонального антитела по любому из пп.1-25, иммуноконъюгата по п.26 или 27 или фармацевтической композиции по любому из пп.30-33.

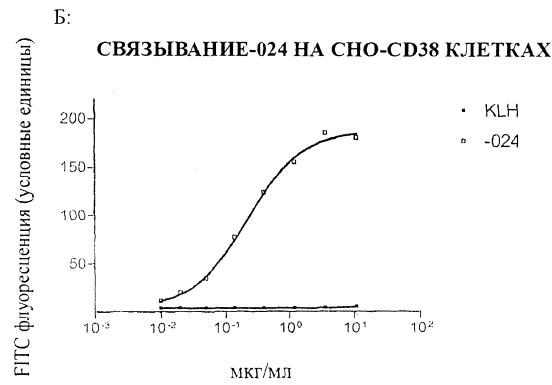
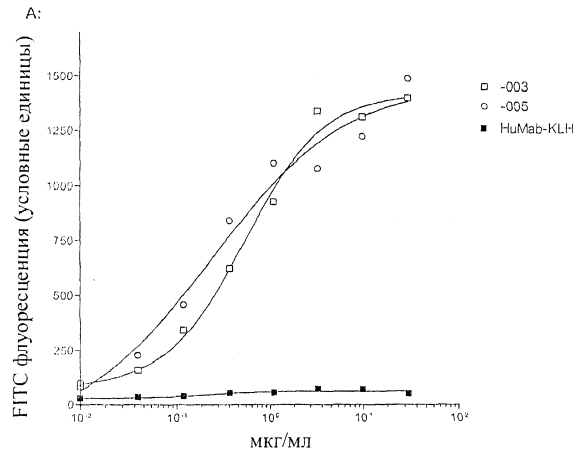
36. Способ профилактики заболевания или нарушения, связанного с экспрессирующими CD38 клетками, у субъекта, причем указанный способ включает введение моноклонального антитела по любому из пп.1-25, иммуноконъюгата по п.26 или 27 или фармацевтической композиции по любому из пп.30-33.

37. Способ по п.35 или 36, отличающийся тем, что указанное заболевание или нарушение является ревматоидным артритом.

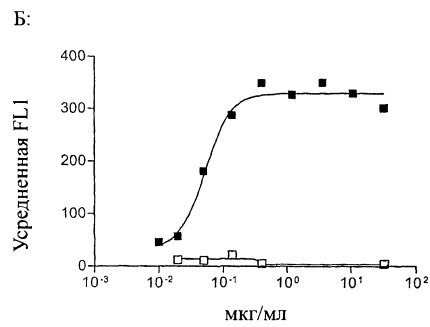
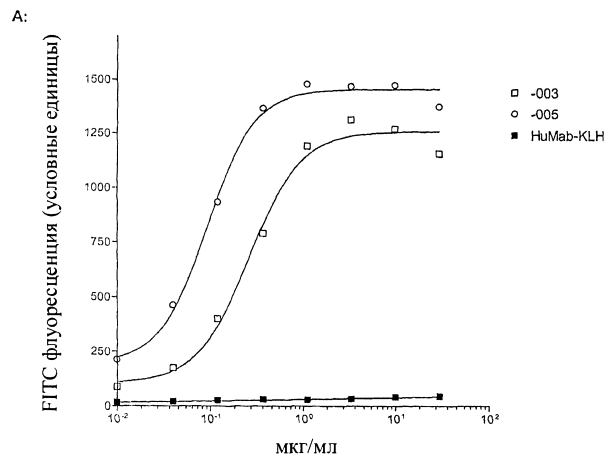
38. Способ по п.35 или 36, отличающийся тем, что указанное заболевание или нарушение является множественной миеломой.

39. Способ по любому из пп.34-38, отличающийся тем, что указанный способ включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов, выбранных из химиотерапевтического агента, противовоспалительного агента или иммуносупрессивного агента и/или иммуномодуляторного агента.

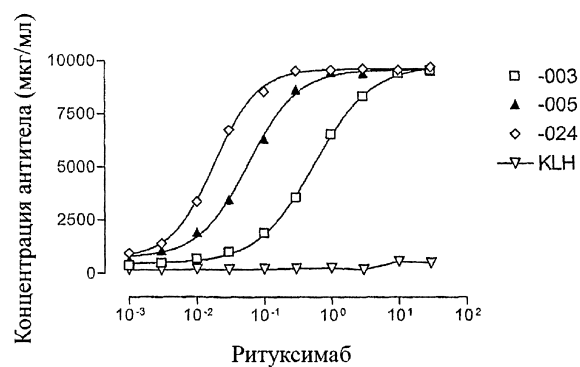
40. Способ по п.39, отличающийся тем, что один или более дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из цисплатина, гефитиниба, цетуксимаба, ритуксимаба, бевацизумаба, эрлотиниба, бортезомиба, талидомида, памидроната, золедроновой кислоты, клодроната, ризендроната, ибадроната, этидроната, алендроната, тилудроната, триоксида мышьяка, леналидомида, филграстима, пегфилграстима, сарграмостима, субероиланилида гидроксамовой кислоты и SCIO-469.



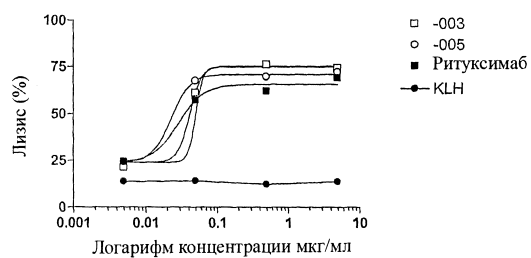
Фиг. 1



Фиг. 2

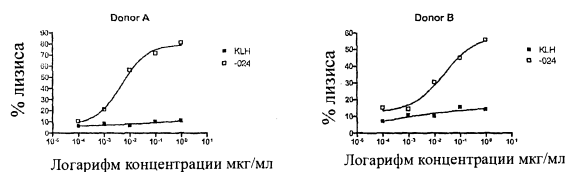


А:



Б:

ADCC на клетках Daudi

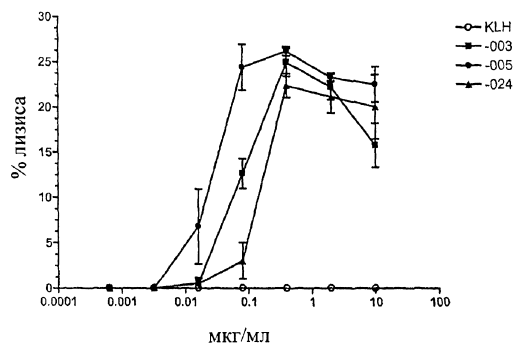


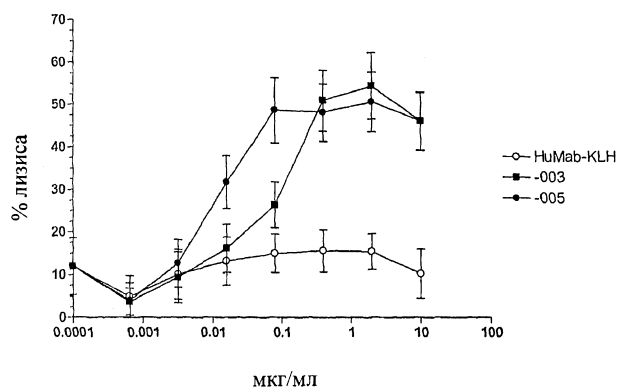
Фиг. 4

А:

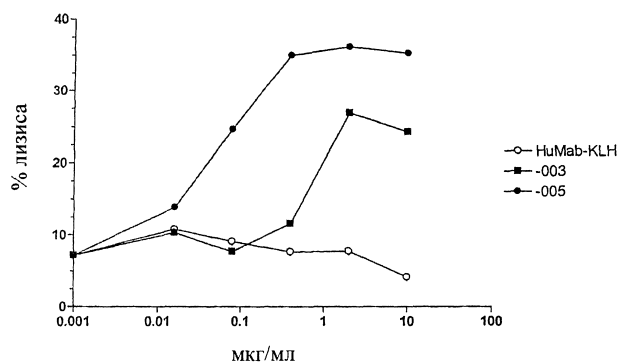


Б:

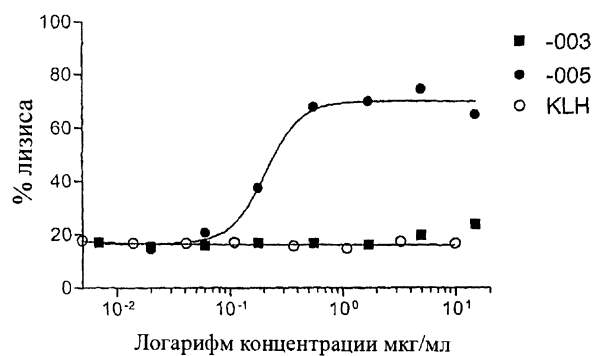




Фиг. 6



Фиг. 7

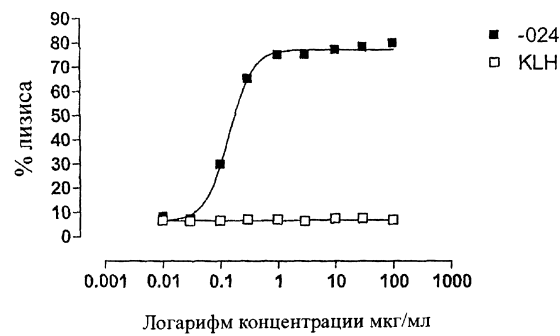


Фиг. 8

А:

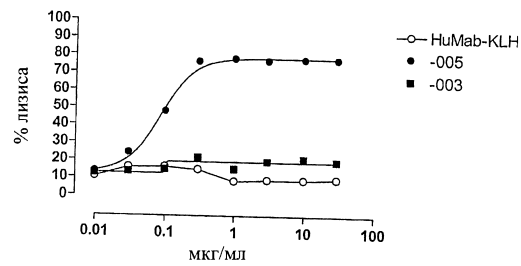


Б:

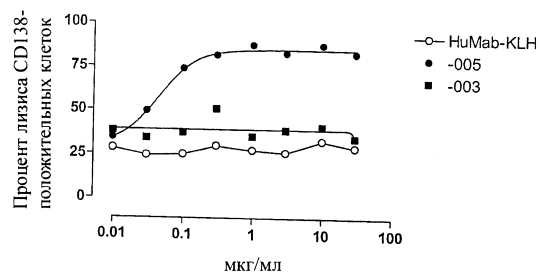


Фиг. 9

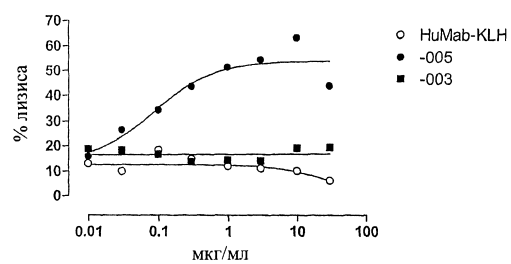
А:



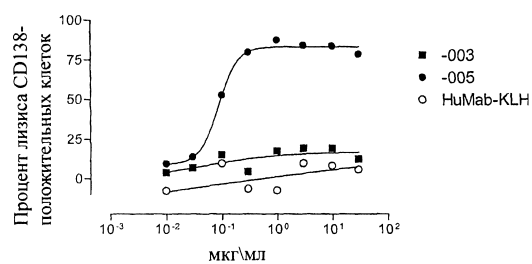
Б:



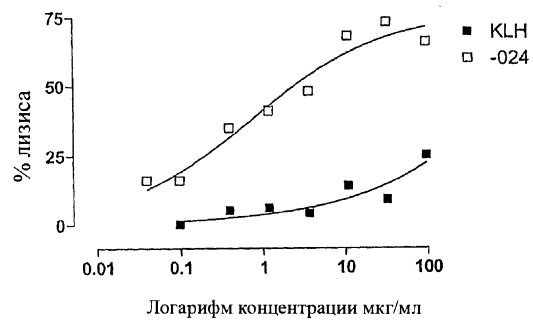
В:



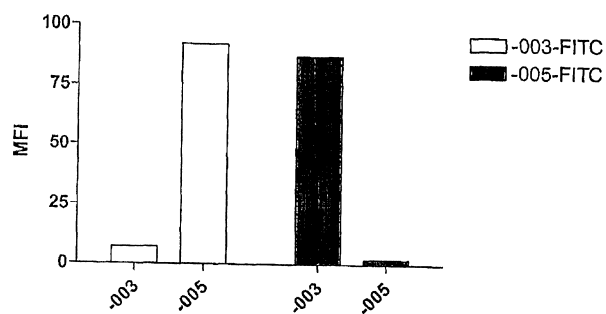
Г:



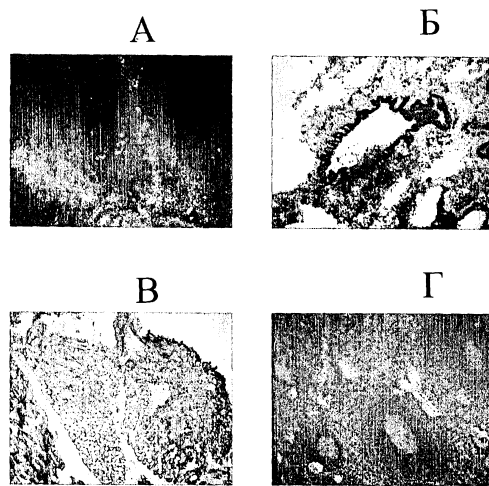
Е:



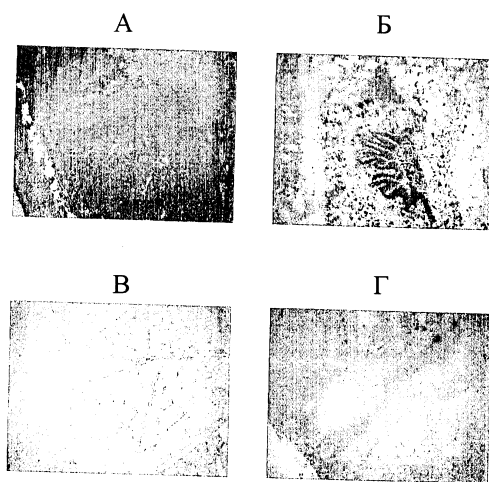
Фиг. 10



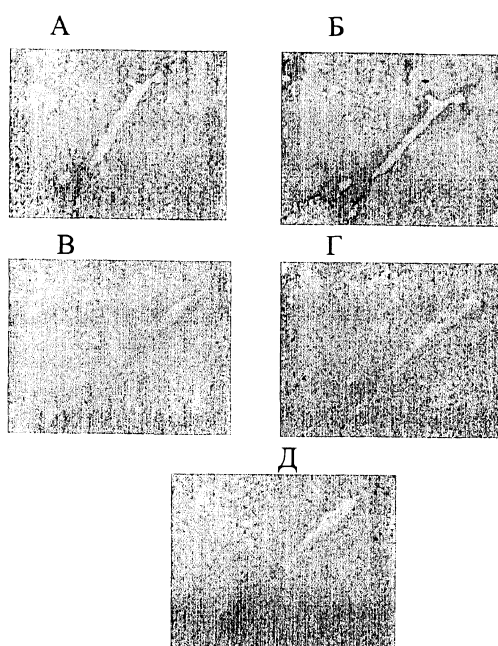
Фиг. 11



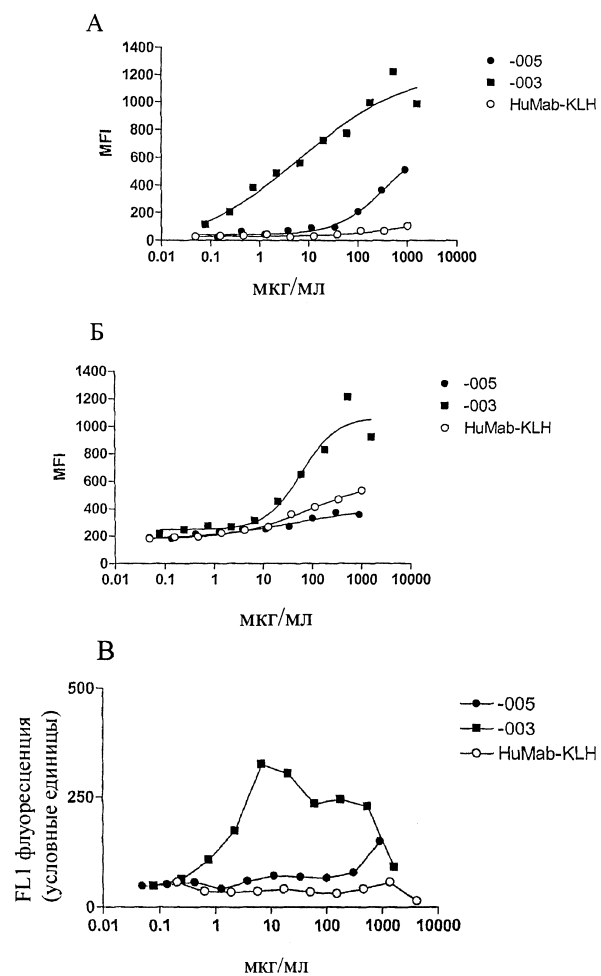
Фиг. 12



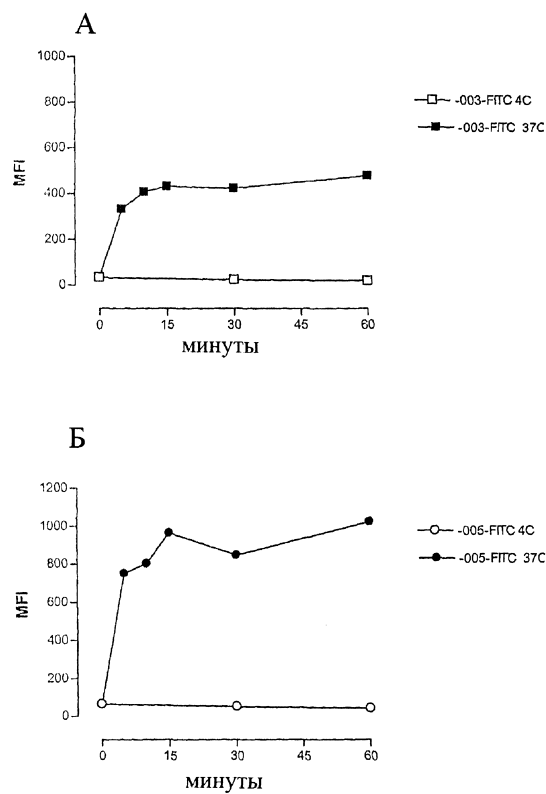
Фиг. 13



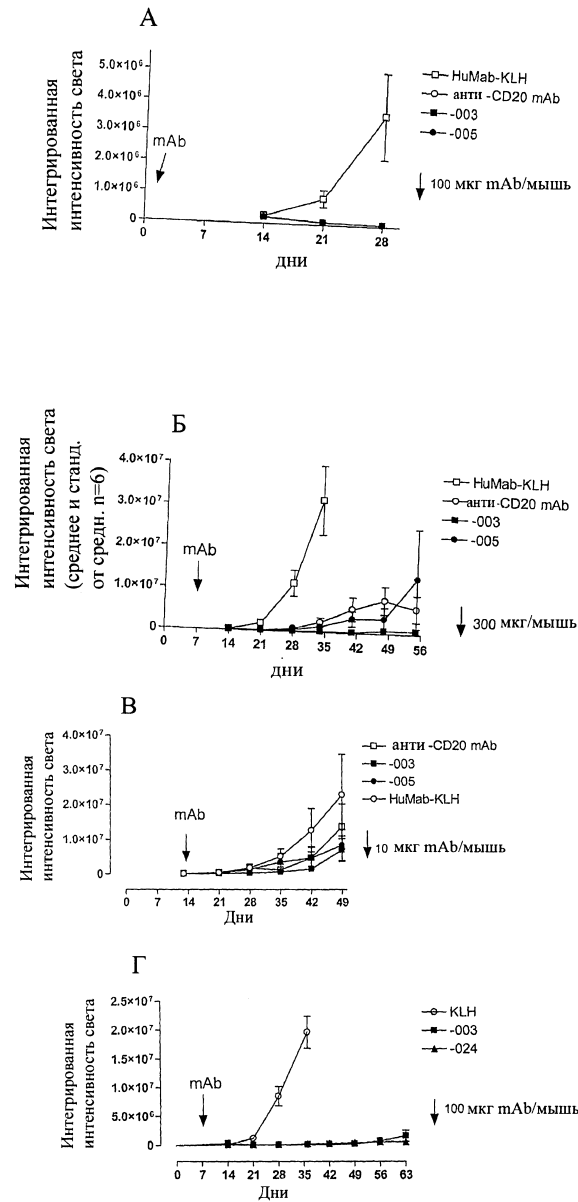
Фиг. 14



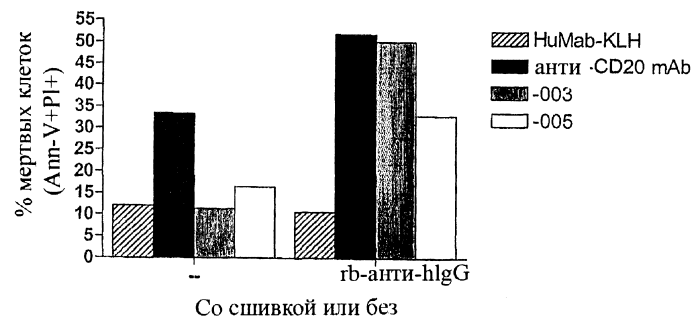
Фиг. 15



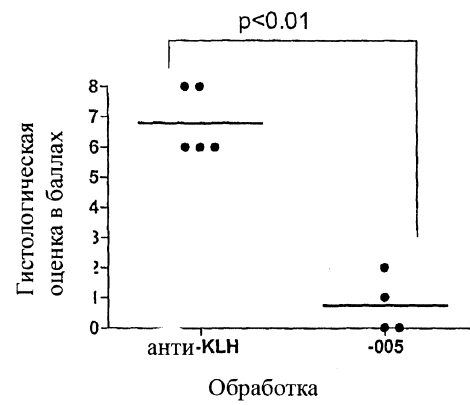
Фиг. 16



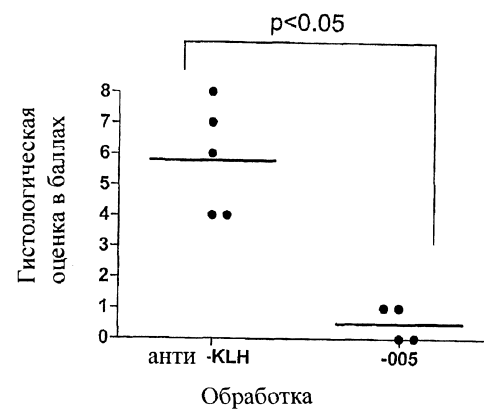
Фиг. 17



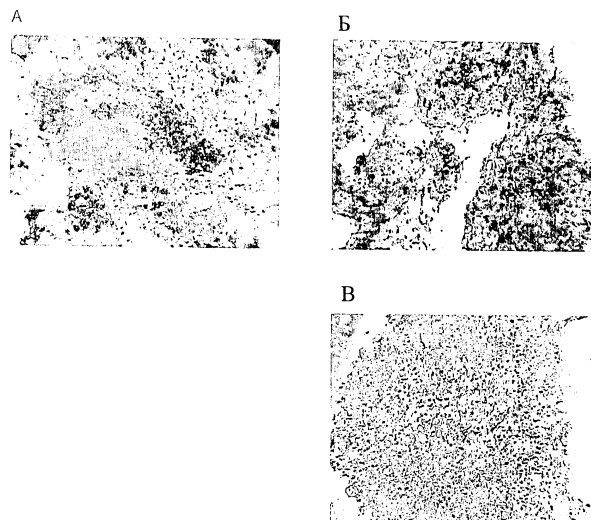
Фиг. 18



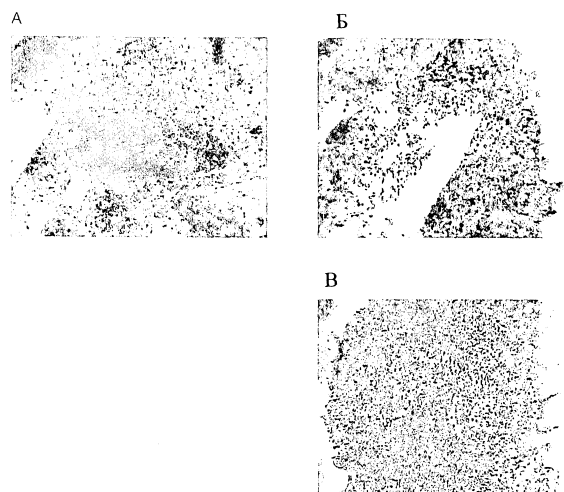
Фиг. 19



Фиг. 20

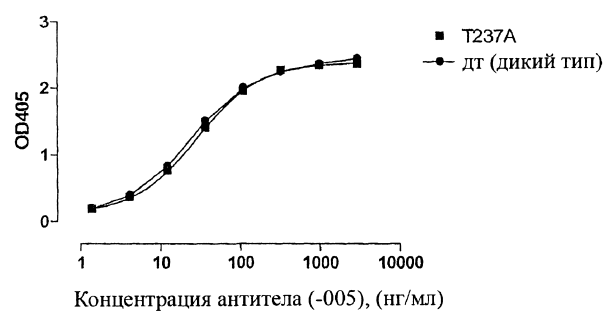
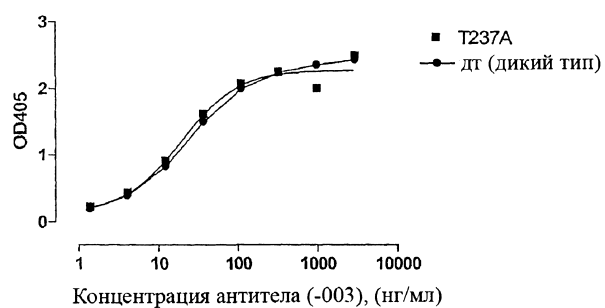


Фиг. 21

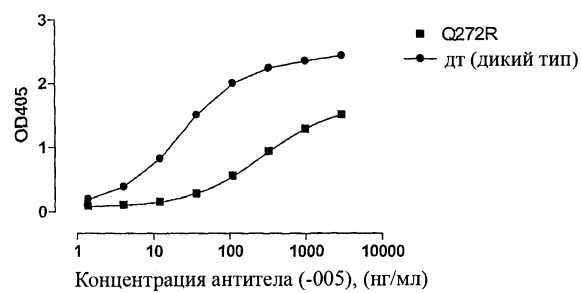
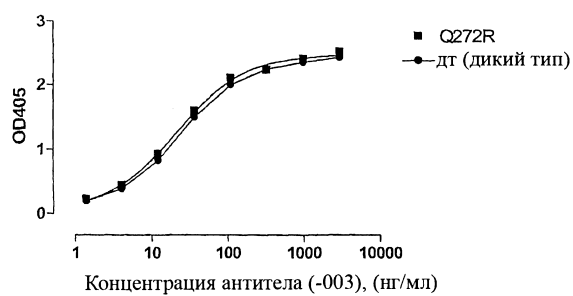


Фиг. 22

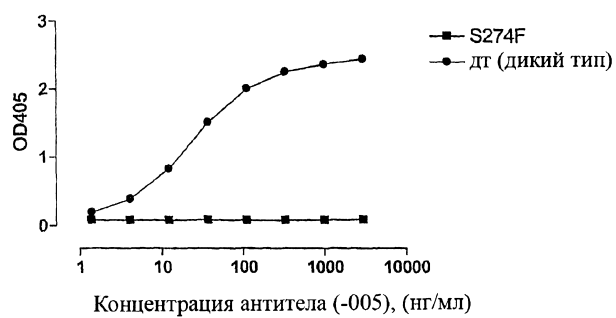
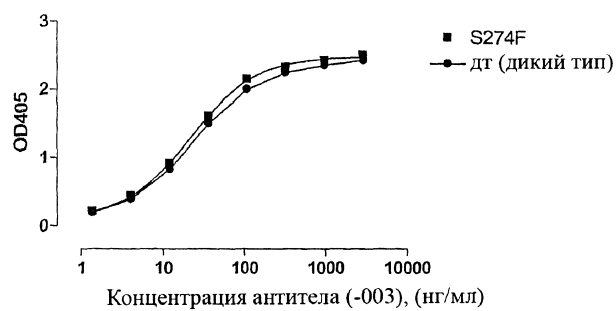
А:



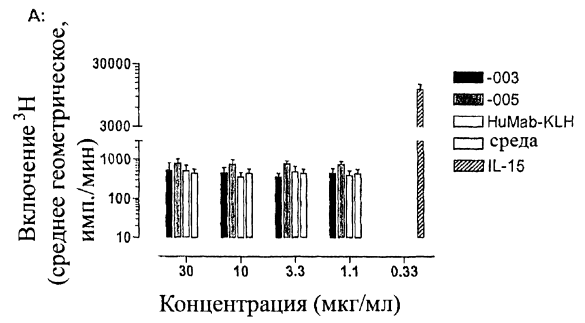
Б:



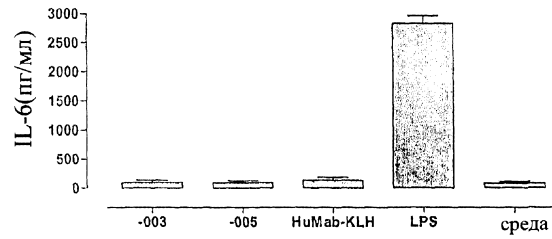
В:



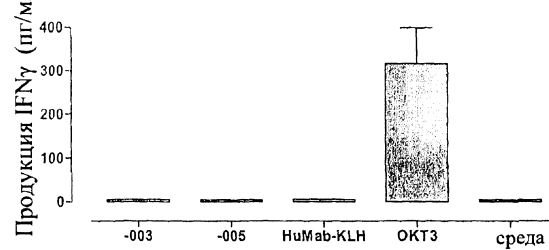
Фиг. 23



Б :

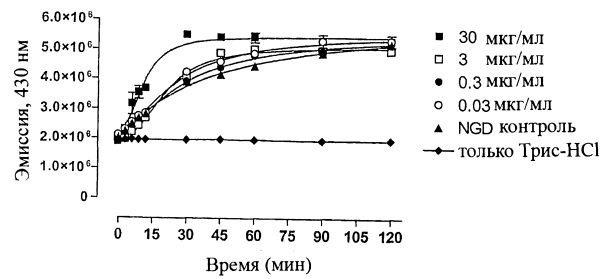


В:

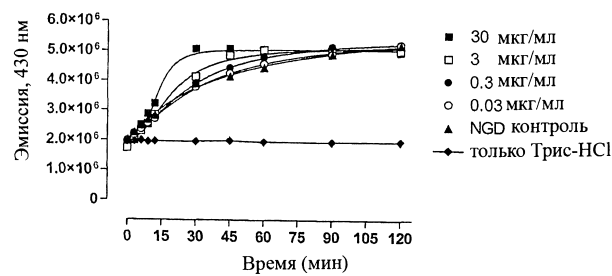


Фиг. 24

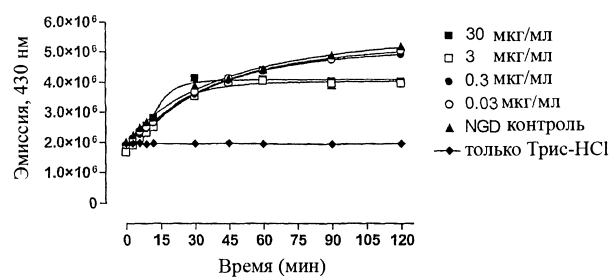
А



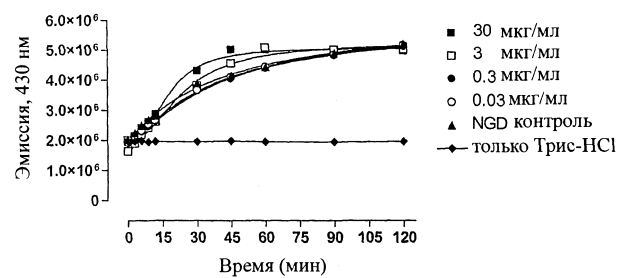
Б



В:

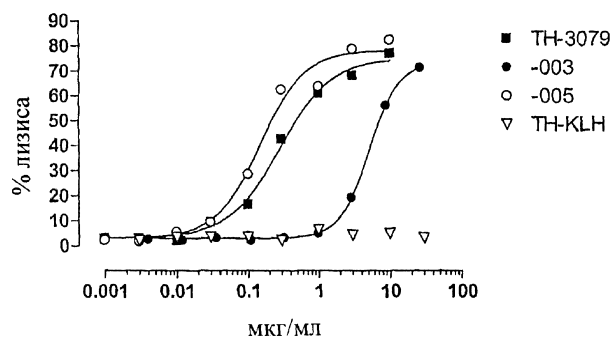


Г:

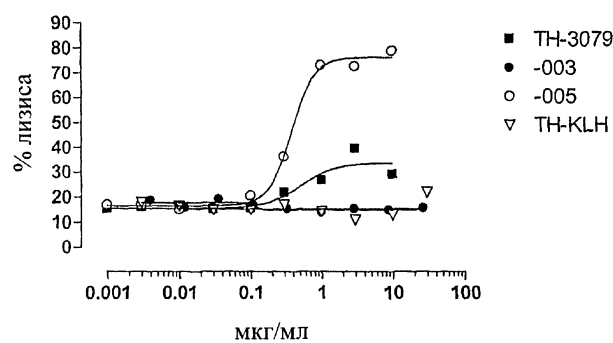


Фиг. 25

CDC CHOCD38

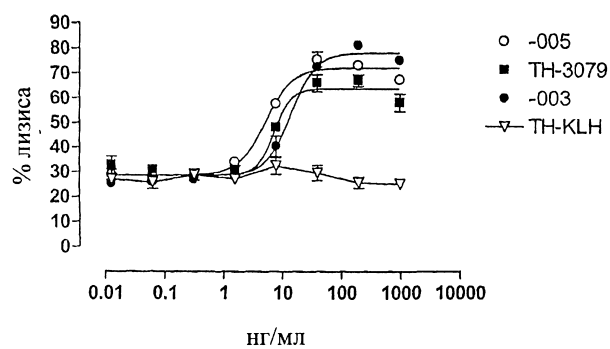


CDC Daudi-люцифераза



В

Донор В клеток Daudi



Фиг. 26



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2