



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020016271-0 A2



(22) Data do Depósito: 11/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/12/2020

(54) Título: ANTICORPO DA PROTEÍNA CD38 E APLICAÇÃO DO MESMO

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/02/2018 CN 201810144817.4.

(71) Depositante(es): HANGZHOU SUMGEN BIOTECH CO., LTD.; SUMGEN MAB (BEIJING) BIOTECH CO., LTD..

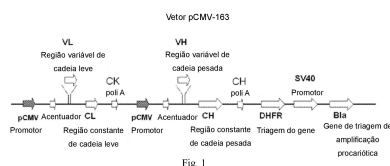
(72) Inventor(es): MING LV; XIAORAN DING; SHIWEI MIAO; BIN TAN; XUEGONG WANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2019074806 de 11/02/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/154421 de 15/08/2019

(85) Data da Fase Nacional: 10/08/2020

(57) Resumo: Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a uma proteína CD38 em um valor de KD abaixo de 1×10^{-9} M é fornecido pela invenção. O anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo apresenta reconhecimento específico forte e capacidades de ligação para a proteína CD38 e pode matar as células CD38+ por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose. Uma aplicação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo na prevenção e tratamento de tumores é adicionalmente fornecida pela presente invenção.



“ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA A CD38, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA, MÉTODO PARA PREPARAR O DITO ANTICORPO OU FRAGMENTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO OU DO FRAGMENTO PARA PREVENIR OU TRATAR TUMORES E MÉTODO PARA INIBIR A LIGAÇÃO DE UMA PROTEÍNA CD38 A UM LIGANTE DE CD38”

CAMPO TÉCNICO

[001] O presente pedido refere-se ao campo biomédico, em particular, a um anticorpo capaz de se ligar à proteína CD38.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

[002] A proteína CD38 é uma exonuclease bifuncional que pode catalisar a conversão de NAD⁺ em ADP-ribose cíclica (cADPR, ADP-ribose cíclica) e hidrolisar cADPR em ADP ribose. A proteína CD38 é um dos antígenos expressados em plasmócitos malignos e expressados em várias células hematopoiéticas malignas, compreendendo, mas não limitadas às células de mieloma múltiplo, células de leucemia linfoblástica crônica de células B e células de leucemia linfocítica aguda de células B.

[003] Entretanto, os anticorpos CD38 correntemente desenvolvidos apresentam atividade de reconhecimento limitada, atividade citotóxica limitada e capacidade limitada em inibir tumores, portanto, há uma necessidade urgente quanto ao desenvolvimento de um novo anticorpo CD38 para o desenvolvimento de novos fármacos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] O presente pedido fornece um anticorpo CD38 e uma aplicação do mesmo. O anticorpo CD38 fornecido no presente pedido pode compreender uma ou mais entre as seguintes propriedades: 1) pode se ligar à proteína CD38 com afinidade e especificidade maiores; 2) pode matar células CD38⁺ por meio de citotoxicidade

mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose; 3) pode matar e danificar células tumorais e/ou inibir o crescimento do tumor; 4) pode ser usado para prevenir ou tratar tumores; 5) pode inibir a ligação de uma proteína CD38 ao ligante CD38. O presente pedido fornece adicionalmente um método de preparação e aplicação do anticorpo CD38.

[005] Por um lado, o presente pedido fornece um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a uma proteína CD38 em um valor de K_D de 1×10^{-9} M ou menor.

[006] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode matar e danificar células tumorais e/ou inibir o crescimento do tumor por meio de ligação específica à proteína CD38.

[007] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode matar células CD38⁺ por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose.

[008] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido não se liga ou substancialmente não se liga a BSA, CD19, TROP2, CD47, AXL ou Gas6 e outros antígenos não relacionados.

[009] Em algumas formas de realização, os tumores compreendem um tumor CD38 positivo. Em algumas formas de realização, o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

[010] Em algumas formas de realização, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[011] Em algumas formas de realização, a célula tumoral compreende aquelas selecionadas a partir do grupo que compreende célula Raji, célula Daudi, célula Ramos e célula RPMI8226.

[012] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a um ou mais resíduos correspondentes aos resíduos de aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 humana quando se liga à proteína CD38 (em que a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 60 a 89 da proteína CD38 humana é mostrada na SEQ ID NO: 15).

[013] Em algumas formas de realização, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que compreende anticorpo monoclonal, anticorpo de cadeia única, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e anticorpo completamente humano.

[014] Em algumas formas de realização, o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir do grupo que compreende Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv e ScFv.

[015] Em algumas formas de realização, a proteína CD38 é a proteína CD38 humana ou proteína CD38 de macaco. Por exemplo, a proteína CD38 pode não ser proteína CD38 de camundongo ou pode não ser proteína CD38 de rato.

[016] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com o presente pedido, compete com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38, em que o anticorpo de referência compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve do anticorpo de referência compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3, a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1; a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2; a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3, a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3, a HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4; a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5; e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

[017] Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia leve do

anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7, e a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

[018] Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22. Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência ou o fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

[019] Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23. Por exemplo, a cadeia pesada do anticorpo de referência ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

[020] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, no presente pedido, compreende a cadeia leve de um anticorpo ou de um fragmento do mesmo. Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR1, e a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1. Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR2, e a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2. Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR3, e a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3.

[021] Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve VL, e a região variável de cadeia leve VL compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7.

[022] Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende ainda uma região constante humana. Em algumas formas de realização, a região constante humana compreende uma região constante de Igk humana.

[023] Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22. Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

[024] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada de um anticorpo ou de um fragmento do mesmo. Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR1, e a HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4. Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR2, e a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5. Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR3, e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

[025] Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada VH, e a região variável de cadeia pesada VH compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

[026] Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende ainda uma região constante humana. Em algumas formas de realização, a região constante humana compreende uma região constante da IgG humana. Em algumas formas de realização, a região constante da IgG

compreende uma região constante da IgG1 humana.

[027] Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23. Por exemplo, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

[028] Por outro lado, o presente pedido fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido.

[029] Em algumas formas de realização, pelo menos uma entre as moléculas de ácido nucleico é otimizada no códon.

[030] Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende uma ou mais sequências de polinucleotídeos selecionadas a partir do grupo que compreende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14.

[031] Por outro lado, o presente pedido fornece um vetor, que compreende a molécula de ácido nucleico no presente pedido.

[032] Por outro lado, o presente pedido fornece uma célula, que compreende a molécula de ácido nucleico no presente pedido ou o vetor no presente pedido.

[033] Por outro lado, o presente pedido fornece um método for preparar um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. O método compreende cultivar a célula no presente pedido sob condições que permitam a expressão do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[034] Por outro lado, o presente pedido fornece uma composição farmacêutica, que compreende o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a molécula de ácido nucleico, o vetor e/ou a célula no presente pedido e, opcionalmente, adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis.

[035] Por outro lado, o presente pedido fornece uma aplicação do anticorpo ou de um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo na preparação de medicamentos para prevenir ou tratar tumores.

[036] Em algumas formas de realização, os tumores compreendem um tumor CD38 positivo. Em algumas formas de realização, o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia. Em algumas formas de realização, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[037] Por outro lado, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente pedido pode ser usado para prevenir ou tratar tumores.

[038] Em algumas formas de realização, os tumores compreendem um tumor CD38 positivo. Em algumas formas de realização, o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia. Em algumas formas de realização, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[039] Por outro lado, o presente pedido fornece um método para prevenir ou tratar tumores. O método compreende administrar a um indivíduo em necessidade o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, o ácido nucleico molecular, o vetor, a célula e/ou a composição farmacêutica no presente pedido.

[040] Em algumas formas de realização, os tumores compreendem um tumor CD38 positivo. Em algumas formas de realização, o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia. Em algumas formas de realização, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[041] Por outro lado, o presente pedido fornece um método para inibir a ligação de uma proteína CD38 a um ligante CD38, e o método compreende administrar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a molécula

de ácido nucleico, o vetor e/ou a célula no presente pedido.

[042] Em algumas formas de realização, o ligante CD38 compreende CD31.

[043] Aspectos e vantagens adicionais da presente divulgação tornar-se-ão prontamente evidentes aos técnicos no assunto a partir da seguinte descrição detalhada, em que apenas as formas de realização ilustrativas da presente divulgação são mostradas e descritas. Diversas modificações das formas de realização da divulgação descrita neste relatório agora ocorrerão para os técnicos no assunto sem divergir da divulgação. Conseqüentemente, os desenhos e descrição da presente divulgação devem ser considerados como ilustrativos por natureza, mas não como restritivos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[044] Características específicas da invenção apresentadas neste pedido são apresentadas nas reivindicações anexas. As características e vantagens das invenções do presente pedido podem ser melhor entendidas com referência às formas de realização exemplares e aos desenhos anexos. Uma breve descrição dos desenhos é a seguinte:

[045] A Fig. 1 mostra um mapa físico da construção do anticorpo SG003 do presente pedido em um vetor de expressão de anticorpo completo.

[046] A Fig. 2 mostra a capacidade de ligação do anticorpo SG003 do presente pedido a uma proteína CD38.

[047] A Fig. 3 mostra os resultados do reconhecimento específico da proteína CD38 pelo anticorpo SG003 do presente pedido.

[048] A Figs. 4A a 4D mostram a capacidade de ligação do anticorpo SG003 do presente pedido à proteína CD38 sobre a superfície de células representativas.

[049] As Figs. 5A a 5D mostram a atividade de ADCC do anticorpo SG003 do presente pedido sobre as células representativas.

[050] A Fig. 6 mostra o efeito inibitório do anticorpo SG003 do presente pedido

sobre o crescimento do tumor.

[051] Fig. 7 mostra o efeito da administração do anticorpo SG003 do presente pedido sobre a taxa de sobrevivência de camundongos.

[052] As Figs. 8A a 8B mostram a capacidade de ligação da administração do anticorpo SG003 do presente pedido às moléculas de CD38 originadas a partir de gêneros diferentes.

[053] A Fig. 9 mostra a capacidade de ligação do anticorpo mutante aleatório SG003 do presente pedido às moléculas de CD38.

[054] A Fig. 10 mostra a circunstância do epítipo do anticorpo SG003 do presente pedido que se liga à proteína CD38.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO

[055] As formas de realização da presente invenção são descritas abaixo por via das formas de realização específicas e os técnicos no assunto podem facilmente apreciar outras vantagens e efeitos da presente invenção a partir da divulgação do presente relatório descritivo.

[056] No presente pedido, o termo “anticorpo” refere-se usualmente a um peptídeo capaz de reconhecer e/ou neutralizar especificamente um antígeno específico. Por exemplo, o anticorpo pode compreender uma imunoglobulina composta de pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) ligadas entre si por ligações dissulfeto e pode compreender qualquer molécula compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. O termo “anticorpo” compreende um anticorpo monoclonal, um fragmento de um anticorpo ou um derivado de anticorpo, compreendendo, mas não limitado a anticorpo humano (anticorpo completamente humano), anticorpo humanizado, anticorpo quimérico, anticorpo de cadeia única (por exemplo, scFv) e um fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo (por exemplo, fragmento Fab, Fab' e (Fab)₂). O termo “anticorpo” compreende ainda todas as formas recombinantes do anticorpo, tais como, um anticorpo expressado em

uma célula procariótica, anticorpo não glicosilado e qualquer fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo do presente pedido e um derivado do mesmo. Cada cadeia pesada pode ser composta de uma região variável de cadeia pesada (VH) e de uma região constante de cadeia pesada. Cada cadeia leve pode ser composta de uma região variável de cadeia leve (VL) e de uma região constante de cadeia leve. As regiões VH e VL podem ser ainda divididas em regiões hipervariáveis (conhecidas como regiões determinantes de complementaridade (CDRs)), que são dispersas entre regiões mais conservadas conhecidas como regiões de estrutura (FRs). Cada VH e VL pode ser composta de três CDRs e quatro FRs, que podem estar dispostas a partir do terminal amino até o terminal carbóxi em uma ordem de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve contêm domínios de ligação que interagem com o antígeno. As regiões constantes do anticorpo podem mediar a ligação da imunoglobulina a um tecido hospedeiro ou a um fator, que compreende uma pluralidade de células (por exemplo, células efectoras) do sistema imunológico e o primeiro componente (C1q) do sistema do complemento clássico.

[057] No presente pedido, o termo “fragmento de ligação ao anticorpo” refere-se usualmente a um ou mais fragmentos do anticorpo que servem, especificamente, para se ligar ao antígeno. A função de ligação ao antígeno do anticorpo pode ser implementada pelo fragmento de comprimento total do anticorpo. A função de ligação ao antígeno do anticorpo também pode ser implementada pelos seguintes: uma cadeia pesada compreendendo um fragmento de Fv, ScFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab')₂, ou uma cadeia leve compreendendo um fragmento de Fv, ScFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab')₂. (1) Fragmento Fab, isto é, um fragmento monovalente compreendendo os domínios VL, VH, CL e CH; (2) Fragmento F(ab')₂, um fragmento divalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ligação dissulfeto na região da dobradiça; (3) um fragmento Fd compreendendo os domínios VH e CH; (4) um

fragmento Fv compreendendo os domínios VL e VH em um braço de um anticorpo; (5) um fragmento dAb compreendendo um domínio VH (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544 a 546); (6) região determinante de complementaridade isolada (CDR); e (7) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que são opcionalmente ligadas por um ligante. Além disso, um Fv de molécula de cadeia única monovalente (scFv) formado pelo emparelhamento de VL e VH pode ser adicionalmente incluído (veja Bird *et al.*, (1988) Science 242: 423 a 426; e Huston *et al.*, (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85: 5879 a 5883). A “porção de ligação ao antígeno” pode compreender adicionalmente uma proteína de fusão de imunoglobulina que compreende um domínio de ligação selecionado a partir do grupo que compreende (1) um peptídeo do domínio de ligação fundido com um peptídeo da região de imunoglobulina da dobradiça; (2) uma região constante CH2 da cadeia pesada de imunoglobulina fundida com uma região da dobradiça; e (3) uma região constante CH3 da cadeia pesada de imunoglobulina fundida com uma região constante CH2.

[058] No presente pedido, os termos “proteína CD38” e “antígeno CD38” são usados permutavelmente neste relatório e compreendem qualquer variante, isotipo e espécie de homólogo de CD38, que são naturalmente expressados em células ou expressados em células transfectadas com um gene CD38. No presente pedido, o CD38 pode ser um CD38 humano com um número de acesso no GenBank de BAA18966.1. No presente pedido, o CD38 pode ser um CD38 de macaco, tal como, Macaque CD38 com um número de acesso no GenBank de AAT36330.1. A proteína CD38 do presente pedido também pode ser conhecida como ADP ribosil ciclase 1, cADPr hidrolase 1, Cd38-rs1, ADP ribose hidrolase cíclica 1, antígeno I-19 ou NIM-R5. Uma “célula CD38⁺” refere-se usualmente a uma célula que expressa a proteína CD38. Também pode ser conhecida como uma célula CD38 positiva. Uma “célula CD38⁻” refere-se usualmente a uma célula que não expressa substancialmente a proteína CD38.

[059] No presente pedido, o termo “proteína CD31” refere-se usualmente a uma glicoproteína transmembranar de 130 a 140 kDa encontrada na superfície de plaquetas, na articulação de células endoteliais cultivadas e nas linhas mielócitas, e também é conhecida como molécula de adesão da célula endotelial da plaqueta 1 (PECAM-1/CD31). No presente pedido, a CD31 pode ser uma CD31 humana com um número de acesso no GenBank de NP_000433.4. A CD31 pode ser usada como um ligante para CD38 desempenhar um papel em trombose e angiogênese.

[060] No presente pedido, o termo “ADCC” é citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) e significa, usualmente, que uma célula com atividade matadora reconhece o segmento de Fc revestido no antígeno de destino através do receptor de Fc (FcR) expressado em sua superfície. Com a ajuda de ADCC, as células efectoras do sistema imunológico dissolvem ativamente as células alvo cujos antígenos da superfície da membrana foram ligados por anticorpos específicos.

[061] No presente pedido, o termo “CDC” é citotoxicidade dependente do complemento (CDC), e refere-se usualmente a um efeito citotóxico em que envolve um complemento. Isto é, o anticorpo específico se liga ao antígeno correspondente na superfície da membrana celular para formar um complexo e ativar a trajetória clássica do complemento. O complexo de ataque à membrana formado produz um efeito lítico sobre a célula alvo.

[062] No presente pedido, o termo “câncer” refere-se usualmente ou descreve um estado fisiológico de um mamífero, que pode ser tipicamente **CARACTERIZADO** por desregulação da proliferação ou sobrevivência celular. Exemplos de câncer compreendem, mas não são limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia, bem como tumor maligno linfoide. Por exemplo, o câncer pode ser linfoma.

[063] No presente pedido, o termo “linfoma” refere-se usualmente ao tumor maligno no sistema linfático. A ocorrência de linfoma é devido à proliferação

descontrolada de células linfonodais ou células linfáticas e a geração de células cancerígenas com capacidades anormais que podem invadir outros tecidos do corpo. O linfoma tem muitos subtipos, em que os dois principais tipos são o linfoma de Hodgkin e o linfoma não Hodgkin. No presente pedido, o termo “linfoma de Hodgkin” (HL) refere-se usualmente a uma classe de linfoma produzida por linfócitos de glóbulos brancos. No presente pedido, o termo “linfoma não Hodgkin” (NHL) refere-se usualmente a outras classes de linfoma exceto o linfoma de Hodgkin.

[064] No presente pedido, o termo “leucemia” refere-se usualmente a uma doença proliferativa maligna do sistema hematopoiético que refere-se usualmente a uma classe de doenças causadas por proliferação massiva e acúmulo de células de leucemia. As células de leucemia clonal proliferam amplamente e se acumulam na medula óssea e em outros tecidos hematopoiéticos, devido à proliferação descontrolada, disdiferenciação e inibição de apoptose ou mecanismos similares, se infiltram em outros tecidos e órgãos não-hematopoiéticos e, entretanto, inibem a função hematopoiética normal. Os seguintes podem ser encontrados clinicamente: graus variados de anemia, sangramento, febre com infecção, bem como aumento do fígado, baço e glândulas linfáticas e dor óssea.

[065] No presente pedido, o termo “mieloma múltiplo” (MM) refere-se usualmente a um tumor maligno que invade a medula óssea devido à proliferação anormal de células plasmáticas. O mieloma múltiplo faz com que as células cancerígenas se acumulem na medula óssea, fazendo com que as células sanguíneas saudáveis sejam excluídas. As células cancerígenas produzem proteínas anormais que podem causar complicações em vez de anticorpos normais.

[066] No presente pedido, o termo “célula Raji” refere-se usualmente a uma linhagem celular humana contínua capaz de produzir cepas de vírus Epstein-Barr. O vírus transformará linfócitos do cordão umbilical e induzirá o antígeno inicial na célula Raji. A célula Raji é amplamente usada como um hospedeiro de transfecção e também

é usada para entender os tumores malignos de células hematopoiéticas e outras células. Além disso, visto que a célula Raji possui e expressa vários receptores que expressam certos componentes do complemento, bem como receptores de Fc da proteína G da imunoglobulina, também é usada para detectar complexos imunes.

[067] No presente pedido, o termo “célula Daudi” refere-se usualmente a uma linhagem celular derivada do linfoma de Burkitt. Embora a célula Daudi tenha uma cadeia pesada de Classe I intracelular, nenhuma molécula de antígeno leucocitário humano de Classe I (HLA) se expressa em sua superfície. Isso ocorre pelo fato de que seu gene codifica a proteína β 2-microsfera (β 2m) que é defeituosa, de modo que a proteína não possui um mRNA traduzível.

[068] No presente pedido, o termo “célula Ramos” refere-se usualmente a uma linhagem celular de linfoma de Burkitt. A célula não transporta a cepa do vírus Epstein-Barr e segrega IgM.

[069] No presente pedido, o termo “célula RPMI8226” refere-se usualmente a uma linhagem celular de mieloma múltiplo humano.

[070] No presente pedido, o termo “ K_D ” é permutavelmente usado com “KD” e refere-se usualmente à constante de dissociação de equilíbrio para uma interação anticorpo-antígeno específica em M (mol/L). KD pode ser calculado com base nas concentrações de uma substância AB e das substâncias A e B dissociadas: $KD = c(A) \cdot c(B) / c(AB)$. Pode ser conhecido a partir desta fórmula que, quanto maior o valor de KD, maior é a dissociação e mais fraca é a afinidade entre as substâncias A e B; ao contrário, quanto menor o valor de KD, menor é a dissociação e mais forte é a afinidade entre as substâncias A e B.

[071] No presente pedido, o termo “anticorpo monoclonal” refere-se usualmente a uma população de anticorpos substancialmente homólogos, isto é, vários anticorpos nesta população são os mesmos, exceto as mutações de ocorrência natural que podem existir em pequenas quantidades. O anticorpo monoclonal é

altamente específico e tem como alvo direto um sítio único antigênico. Por exemplo, o anticorpo monoclonal pode ser preparado pela tecnologia de hibridoma ou é possível produzir o anticorpo monoclonal por meio do uso de um método de DNA recombinante em bactérias, eucariontes ou células vegetais. O anticorpo monoclonal também pode ser obtido a partir da biblioteca de anticorpos de fagos, usando uma tecnologia descrita, por exemplo, em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624 a 628 (1991) e Marks *et al.*, *Mol. Biol.*, 222:581 a 597 (1991).

[072] No presente pedido, o termo “anticorpo de cadeia única” (scFv) refere-se usualmente a uma molécula formada pela ligação de uma região variável de cadeia pesada do anticorpo a uma região variável de cadeia leve por meio de um ligante oligopeptídeo.

[073] No presente pedido, o termo “anticorpo quimérico” refere-se usualmente a um anticorpo em que uma porção de cada cadeia pesada ou cadeia leve de sequência de aminoácidos é homóloga da sequência de aminoácidos em que o anticorpo correspondente de uma espécie específica, ou corresponde a uma categoria específica, e o resto da cadeia é homóloga da sequência correspondente em outra espécie. Por exemplo, tanto a região variável da cadeia leve quanto da cadeia pesada, são derivadas da região variável de uma espécie animal (tal como, camundongo, rato, etc.), enquanto a porção constante é homóloga a uma sequência de anticorpos de outra espécie (tal como, humano). Por exemplo, para obter anticorpos quiméricos, as regiões variáveis podem ser produzidas pelo uso de células B ou células de hibridoma não derivadas de humanos, e a região constante combinada com as mesmas, é derivada de humanos. A região variável tem uma vantagem de fácil produção e a sua especificidade não é afetada pela fonte da região constante combinada com a mesma. Ao mesmo tempo, visto que a região constante do anticorpo quimérico pode ser derivada de humanos, a possibilidade de o anticorpo evocar uma resposta imune após a injeção ser menor do que a de um anticorpo em que a região constante é derivada

de uma fonte não humana.

[074] No presente pedido, o termo “anticorpo humanizado” refere-se usualmente a um anticorpo quimérico, que contém menos sequências derivadas de proteínas da imunoglobulina não humana, de modo a reduzir a imunogenicidade quando um anticorpo heterólogo é introduzido em humanos, e manter a afinidade de ligação do antígeno completo e especificidade do anticorpo. Por exemplo, o enxerto de CDR (Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986)) e suas variantes podem ser usados; compreendendo “remodelar” (Verhoeyen, *et al.*, 1988 Science 239:1534 a 1536; Riechmann, *et al.*, 1988 Nature 332:323 a 337; Tempest, *et al.*, Bio/Technol 1991 9:266 a 271), “hipercimerização”, (Queen, *et al.*, 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029 a 10033; Co, *et al.*, 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869 a 2873; Co, *et al.*, 1992 J Immunol 148:1149 a 1154) e “revestimento”, (Mark, *et al.*, “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. Nova Iorque: Plenum Press, 1994: 291 a 312), reconstrução de superfície (Patente US US5639641) e outros meios técnicos para humanizar os domínios de ligação de fontes não humanas. Se outras regiões, tais como, regiões da dobradiça e domínios de região constante também forem derivadas de fonte não humanas, estas áreas também poderão ser humanizadas.

[075] No presente pedido, o termo “epítopo” refere-se usualmente a um determinante antigênico, isto é, a fração de uma molécula que é reconhecida pelo sistema imunológico (por exemplo, por um anticorpo). Por exemplo, o epítopo pode ser sítios tridimensionais descontínuos em um antígeno reconhecido pelo sistema imunológico. Os epítopos consistem usualmente de grupos de superfície quimicamente ativos de moléculas (tais como, aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar) e, usualmente, possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Os epítopos podem ser

divididos em epítomos conformacionais e epítomos não conformacionais (epítomos lineares) de acordo com suas estruturas. Os epítomos podem ser compostos de resíduos contínuos, ou podem ser formados por resíduos discretos que se tornam adjacentes devido ao dobramento do polímero de antígeno.

[076] No presente pedido, o termo “IgG” refere-se usualmente à imunoglobulina G. IgG é uma das imunoglobulinas humanas, que compreendem adicionalmente IgA, IgM, IgD e IgE. De acordo com a diferença antigênica da cadeia γ na molécula de IgG, a IgG humana tem quatro subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgG desempenha um papel importante no sistema imunológico. No presente pedido, o termo “IgG1” refere-se usualmente ao subtipo com a maior proporção de IgG que tem alta afinidade com um receptor de Fc.

[077] No presente pedido, o termo “molécula de ácido nucleico” refere-se usualmente a um nucleotídeo isolado, desoxirribonucleotídeo, ribonucleotídeo ou um análogo do mesmo com qualquer comprimento que possa ser isolado de seu ambiente natural ou sintetizado artificialmente.

[078] No presente pedido, o termo “vetor” refere-se usualmente a uma molécula de ácido nucleico capaz de se autorreplicar em um hospedeiro adequado. O vetor pode transferir a molécula de ácido nucleico inserida nas células e/ou entre células. O vetor pode compreender aqueles usados principalmente para inserir DNA ou RNA na célula, usados principalmente para copiar o DNA ou RNA, e usados principalmente para a transcrição de DNA ou RNA e/ou a expressão da tradução. O vetor pode ser um polinucleotídeo que pode ser transcrito e traduzido em um peptídeo ao ser introduzido em uma célula adequada. Usualmente, o vetor pode produzir um produto de expressão desejado cultivando células apropriadas que compreendem o vetor.

[079] No presente pedido, o termo “célula” refere-se usualmente a uma célula, linhagem celular ou cultura celular individual que pode ter ou pode compreender um

plasmídeo ou um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico do presente pedido, ou pode expressar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido. A célula pode compreender a progênie de uma única célula. Devido à mutação natural, acidental ou deliberada, a célula progênica pode não ser completamente idêntica à célula precursora original na morfologia ou no genoma, desde que a célula progênica possa expressar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido. A célula pode ser obtida por transfecção de células *in vitro* com o vetor do presente pedido. A célula pode ser uma célula procariótica (tal como, *E. coli*), ou também pode ser uma célula eucariótica (tal como, célula de levedura, por exemplo, célula COS, célula de ovário de hamster chinês (CHO), célula HeLa, célula HEK293, célula COS-1, célula NS0 ou célula de mieloma). Em algumas formas de realização, a célula é uma célula de mamífero. Por exemplo, a célula de mamífero pode ser uma célula CHO-K1. No presente pedido, o termo “célula recombinante” refere-se usualmente a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. A célula recombinante não compreende apenas uma determinada célula específica, mas também compreende a progênie dessas células.

[080] No presente pedido, os termos “proteína A” e “ProA” são permutavelmente usados neste relatório, e compreendem a proteína A recuperada de sua fonte natural, a proteína A produzida pela síntese (por exemplo, pela síntese de peptídeos ou por tecnologia recombinante), e variantes que retêm a capacidade de ligação da proteína. A proteína A pode ser adquirida a partir de Repligen, Pharmacia e Fermatech. A proteína A é usualmente imobilizada em um material de suporte em fase sólida. O termo “ProA” também se refere a uma coluna de resina de cromatografia de afinidade ou a uma matriz de suporte sólido cromatográfico com a proteína A ligada covalentemente a ela.

[081] No presente pedido, o termo “cerca de” refere-se usualmente a uma

variação dentro de 0,5 % a 10 % de um valor especificado, tal como, uma variação dentro de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % ou 10 % do número especificado.

[082] No presente pedido, o termo “compreendem/compreendendo” usualmente significa compreendendo, incluindo, contendo ou abrangendo. Em alguns casos, o termo também significa “é/são” ou “deve ser composto por”.

ANTICORPO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTICORPO DO MESMO OU VARIANTE

[083] Em um aspecto, o presente pedido fornece um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma variante do mesmo, que se liga à proteína CD38 em um valor K_D de $1 \times 10^{-9}M$ ou inferior (por exemplo, um valor K_D não maior do que cerca de $1 \times 10^{-9}M$, não maior do que cerca de $9 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $8 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $7 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $6 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $5 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $4 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $3 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $2 \times 10^{-10}M$, não maior do que cerca de $1 \times 10^{-10}M$ ou não maior do que cerca de $1 \times 10^{-11}M$ ou inferior).

[084] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido, pode matar as células CD38⁺ por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose.

[085] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou a variante no presente pedido, pode matar e danificar as células tumorais e/ou inibir o crescimento do tumor por ligação específica à proteína CD38. Por exemplo, o tumor pode compreender um tumor CD38 positivo. Por exemplo, o tumor CD38 positivo pode ser selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia. Alternativamente, por exemplo, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin. A célula tumoral pode ser

selecionada a partir do grupo que compreende célula Raji, célula Daudi, célula Ramos e célula RPMI8226. No presente pedido, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode matar e danificar mieloma múltiplo, linfoma, leucemia, linfoma não Hodgkin e células de linfoma de Hodgkin ou inibir o crescimento de mieloma múltiplo, linfoma, leucemia, linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[086] O anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido, pode se ligar a um ou mais resíduos correspondentes aos resíduos de aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 humana quando se liga à C38. Por exemplo, os resíduos de aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 humana são como mostrados na SEQ ID NO: 15.

[087] No presente pedido, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, também pode se ligar aos resíduos de aminoácidos correspondentes aos resíduos de aminoácidos 90 a 119 da proteína CD38 humana, correspondendo aos resíduos de aminoácidos 150 a 159 da proteína CD38 humana, ou correspondendo aos resíduos de aminoácidos 180 a 189 da proteína CD38 humana.

[088] No presente pedido, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, não pode se ligar substancialmente aos resíduos de aminoácidos correspondentes aos resíduos de aminoácido 170 a 179 da proteína CD38 humana, ou não se ligar aos resíduos de aminoácidos correspondentes aos resíduos de aminoácido 291 a 300 da proteína CD38 humana.

[089] O anticorpo do presente pedido pode ser anticorpo monoclonal, anticorpo de cadeia única, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e/ou anticorpo completamente humano. O fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo do presente pedido pode ser fragmento Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv e/ou ScFv.

[090] A proteína CD38 do presente pedido pode ser proteína CD38 humana ou proteína CD38 de macaco. Por exemplo, a proteína CD38 pode não ser proteína CD38 de camundongo, ou pode não ser proteína CD38 de rato. Em algumas formas

de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido não se liga substancialmente à proteína CD38 de camundongo ou à proteína CD38 de rato.

[091] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido, pode competir com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38. O anticorpo de referência pode compreender uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada. Por exemplo, a região variável de cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender LCDR1, LCDR2 e LCDR3, LCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1; LCDR2 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2; LCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3, a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender HCDR1, HCDR2 e HCDR3, HCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4; HCDR2 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5; e HCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

[092] No presente pedido, a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7, e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

[093] No presente pedido, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22; por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20. A cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23; por

exemplo, a cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

[094] Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, e a cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13. Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 16, e a cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 17. Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 18, e a cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 19. Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 20, e a cadeia pesada do anticorpo de referência pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 21.

[095] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com o presente pedido pode compreender a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo.

[096] Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender LCDR1, e LCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1. A cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender LCDR2, e LCDR2 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2. A cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender LCDR3, e LCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3.

[097] A cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo do presente

pedido pode compreender uma região variável de cadeia leve VL, e a região variável de cadeia leve VL pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7.

[098] No presente pedido, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender uma região constante de Igk, por exemplo, pode compreender uma região constante de Igk humana.

[099] No presente pedido, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22:

EIVMTQSPASLSASLGQRAX²⁰ISCRASX²⁷SVSX³¹SAX³⁴SYVHWYQQKSGQ
PPKLLIYLASX⁵⁷X⁵⁸X⁵⁹SGVPARFSGSGSGTDFTLTIHPVESEDVATYYCHHSRX⁹⁷X⁹⁸
PX¹⁰⁰X¹⁰¹FGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22), em que X²⁰ = T ou S; X²⁷ = S ou N; X³¹ = S ou T; X³⁴
= F ou Y; X⁵⁷ = N e D; X⁵⁸ = L ou I; X⁵⁹ = E ou Q; X⁹⁷ = E ou Q; X⁹⁸ = L ou V; X¹⁰⁰ = F
ou S; X¹⁰¹ = T ou S.

[0100] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 11, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada a partir do grupo que compreende:

- (a) substituição de aminoácidos em X²⁰, X²⁷, X³⁴, X⁵⁸, X⁵⁹, X⁹⁷ e/ou X¹⁰⁰;
- (b) substituição de aminoácidos em X³⁴, X⁵⁷, X⁵⁹, X¹⁰⁰ e/ou X¹⁰¹; e
- (c) substituição de aminoácidos em X²⁷, X³¹ e/ou X⁹⁸.

[0101] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 11, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos em X²⁰, X²⁷, X³⁴, X⁵⁸, X⁵⁹, X⁹⁷ e/ou X¹⁰⁰, em que, o aminoácido em X²⁰ pode ser substituído por T ou S; o

aminoácido em X²⁷ pode ser substituído por S ou N; o aminoácido em X³⁴ pode ser substituído por F ou Y; o aminoácido em X⁵⁸ pode ser substituído por L ou I; o aminoácido em X⁵⁹ pode ser substituído por E ou Q; o aminoácido em X⁹⁷ pode ser substituído por E ou Q; e o aminoácido em X¹⁰⁰ pode ser substituído por F ou S.

[0102] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 11, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos em X³⁴, X⁵⁷, X⁵⁹, X¹⁰⁰ e/ou X¹⁰¹, em que, o aminoácido em X³⁴ pode ser substituído por F ou Y; o aminoácido em X⁵⁷ pode ser substituído por N ou D; o aminoácido em X⁵⁹ pode ser substituído por E ou Q; o aminoácido em X¹⁰⁰ pode ser substituído por F ou S; e o aminoácido em X¹⁰¹ pode ser substituído por T ou S.

[0103] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 11, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos em X²⁷, X³¹ e/ou X⁹⁸, em que, o aminoácido em X²⁷ pode ser substituído por S ou N; o aminoácido em X³¹ pode ser substituído por S ou T; e o aminoácido em X⁹⁸ pode ser substituído por L ou V.

[0104] Por exemplo, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

[0105] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido, pode compreender uma cadeia pesada do anticorpo ou um fragmento do mesmo.

[0106] No presente pedido, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender HCDR1, e HCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4. A cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender HCDR2, e HCDR2 pode compreender uma

sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5. Alternativamente, por exemplo, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender HCDR3, e HCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

[0107] A cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender uma região variável de cadeia pesada VH, e a região variável de cadeia pesada VH pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

[0108] No presente pedido, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende adicionalmente uma região constante humana. Por exemplo, a região constante humana pode compreender uma região constante da IgG humana. Por exemplo, a região constante da IgG pode compreender uma região constante da IgG1 humana.

[0109] No presente pedido, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23:

QVQLLES GGGLVQPGGSLKLS CVASGX²⁷X²⁸FSLYX³³MNWVVRQAPGKGLE
WIGKIX⁵²PX⁵⁴SSX⁵⁷X⁵⁸X⁵⁹YX⁶¹PSX⁶⁴KDKFFISRDNANTLYLQMTKVRSEDTALYY
CARLX¹⁰⁰IX¹⁰²X¹⁰³GGX¹⁰⁶X¹⁰⁷YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23), em que X²⁷ = F ou Y; X²⁸
= D ou N; X³³ = W ou Y; X⁵² = N, Q ou S; X⁵⁴ = D, E ou N; X⁵⁷ = T ou S; X⁵⁸ = I ou L;
X⁵⁹ = N ou Q; X⁶¹ = T ou S; X⁶⁴ = L ou V; X¹⁰⁰ = W ou Y; X¹⁰² = A ou G; X¹⁰³ = T ou S;

$X^{106} = F$ ou Y ; $X^{107} = D$ ou N .

[0110] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 13, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos selecionados a partir do grupo que compreende:

- (a) substituição de aminoácidos em X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{52} , X^{54} , X^{59} , X^{102} e/ou X^{103} ;
- (b) substituição de aminoácidos em X^{52} , X^{54} , X^{61} , X^{100} e/ou X^{103} ; e
- (c) substituição de aminoácidos em X^{52} , X^{57} , X^{58} , X^{64} , X^{106} e/ou X^{107} .

[0111] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 13, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo pelo menos compreende a substituição de aminoácidos em X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{52} , X^{54} , X^{59} , X^{102} e/ou X^{103} , em que, o aminoácido em X^{27} pode ser substituído por F ou Y ; o aminoácido em X^{28} pode ser substituído por D ou N ; o aminoácido em X^{33} pode ser substituído por W ou Y ; o aminoácido em X^{52} pode ser substituído por N ou Q ; o aminoácido em X^{54} pode ser substituído por D ou E ; o aminoácido em X^{59} pode ser substituído por N ou Q ; o aminoácido em X^{102} pode ser substituído por A ou G ; e o aminoácido em X^{103} pode ser substituído por T ou S .

[0112] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 13, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos em X^{52} , X^{54} , X^{61} , X^{100} e/ou X^{103} , em que, o aminoácido em X^{52} pode ser substituído por N ou S ; o aminoácido em X^{54} pode ser substituído por D ou N ; o aminoácido em X^{61} pode ser substituído por T ou S ; o aminoácido em X^{100} pode ser substituído por W ou Y ; e o aminoácido em X^{103} pode ser substituído por T ou S .

[0113] Em algumas formas de realização, em comparação à cadeia leve do anticorpo mostrada na SEQ ID NO: 13, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende pelo menos a substituição de aminoácidos em X^{52} , X^{57} , X^{58} ,

X⁶⁴, X¹⁰⁶ e/ou X¹⁰⁷, em que, o aminoácido em X⁵² pode ser substituído por N ou S; o aminoácido em X⁵⁷ pode ser substituído por T ou S; o aminoácido em X⁵⁸ pode ser substituído por I ou L; o aminoácido em X⁶⁴ pode ser substituído por L ou V; o aminoácido em X¹⁰⁶ pode ser substituído por F ou Y; e o aminoácido em X¹⁰⁷ pode ser substituído por D ou N.

[0114] Em algumas formas de realização, a cadeia pesada do anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

[0115] Em algumas formas de realização, no anticorpo ou no fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido, LCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou uma variante da mesma; LCDR2 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2 ou uma variante da mesma; LCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3 ou uma variante da mesma; e HCDR1 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4 ou uma variante da mesma; HCDR2 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5 ou uma variante da mesma; HCDR3 pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6 ou uma variante da mesma. Por exemplo, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender o anticorpo SG003 ou um anticorpo que apresenta a mesma LCDR1-3 e com a mesma HCDR1-3. Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender uma região variável de cadeia leve, a região variável de cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7 ou uma variante da mesma; e a cadeia pesada pode compreender uma região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8 ou uma variante da mesma.

Por exemplo, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender o anticorpo SG003 ou um anticorpo que apresenta a mesma região variável de cadeia leve e a mesma região variável de cadeia pesada. Em algumas formas de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender uma cadeia leve e uma cadeia pesada, a cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, e a cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13. Por exemplo, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender o anticorpo SG003 ou uma sequência de aminoácidos tendo a mesma cadeia leve e a mesma cadeia pesada.

[0116] Em algumas formas de realização, o anticorpo do presente pedido pode ser SG003. LCDR1, LCDR2 e LCDR3 do anticorpo SG003 podem compreender sequências de aminoácidos como mostrado nas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, respectivamente; VL pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7; HCDR1, LCDR2 e LCDR3 podem compreender as sequências de aminoácidos como mostrado nas SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, respectivamente; VH pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8; a cadeia leve pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11; e a cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13.

[0117] Em algumas formas de realização, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido compete com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38 (por exemplo, proteína CD38 humana ou proteína CD38 de macaco). O anticorpo de referência pode compreender LCDR1, LCDR2, LCDR3 e HCDR1, HCDR2, HCDR3, e LCDR1 pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1; LCDR2 pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2; LCDR3 pode compreender a

sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3; HCDR1 pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4; HCDR2 pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5; e HCDR3 pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6. Em algumas formas de realização, o anticorpo de referência pode compreender o anticorpo SG003 ou um anticorpo que apresentam LCDR1, LCDR2, LCDR3 e HCDR1, HCDR2, HCDR3 iguais. Em algumas formas de realização, o anticorpo de referência pode compreender uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7; e a região variável de cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8. Por exemplo, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender o anticorpo SG003 ou um anticorpo que apresenta a mesma região variável de cadeia leve e a mesma região variável de cadeia pesada. Em algumas formas de realização, o anticorpo de referência pode compreender uma cadeia leve e uma cadeia pesada, a cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11 e a cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13. Por exemplo, o anticorpo de referência ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender o anticorpo SG003 ou um anticorpo que apresenta a mesma cadeia leve e a mesma cadeia pesada.

[0118] O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender adicionalmente, nas sequências de aminoácidos da mesma cadeia leve e/ou da cadeia pesada, uma ou mais mutações aleatórias (por exemplo, uma ou mais, uma ou várias substituições de aminoácidos). Por exemplo, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender, em um ou mais sítios na região do quadro L-FR1~L-FR4 da região variável de cadeia leve, uma ou mais mutações aleatórias (por exemplo, uma ou mais, uma ou várias

substituições de aminoácido), e/ou compreender, em um ou mais sítios na região do quadro H-FR1~H-FR4 da região variável de cadeia pesada, uma ou mais mutações aleatórias (por exemplo, uma ou mais, uma ou várias substituições de aminoácido). Por exemplo, após a mutação aleatória, a cadeia leve do anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20; e/ou, a cadeia pesada do anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21. O anticorpo CD38 mutado aleatoriamente ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ainda tem uma capacidade de se ligar, especificamente, à proteína CD38 humana e à proteína CD38 de macaco.

[0119] Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 16; e a cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 17; alternativamente, a cadeia leve do anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 18; e a cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 19; alternativamente, a cadeia leve do anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no presente pedido pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 20; e a cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 21.

[0120] As proteínas, peptídeos e/ou sequências de aminoácidos envolvidas no presente pedido, também devem ser entendidas como abrangendo o seguinte escopo: uma variante ou um homólogo tendo a mesma ou similar função com a proteína ou peptídeo.

[0121] No presente pedido, a variante pode ser uma proteína ou peptídeo obtido por substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos em relação às sequências de aminoácidos da proteína e/ou peptídeo (por exemplo, o anticorpo ou o fragmento do mesmo que se liga especificamente à proteína CD38). Por exemplo, a variante funcional pode compreender uma proteína ou peptídeo com modificação de aminoácidos por substituição, deleção e/ou inserção de pelo menos um, por exemplo, 1 a 30, 1 a 20 ou 1 a 10, ou por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos. A variante funcional pode basicamente permanecer a atividade biológica da proteína ou peptídeo antes da modificação (por exemplo, substituição, deleção ou adição). Por exemplo, a variante funcional pode permanecer pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, ou 100 % da atividade biológica (tal como, capacidade de ligação ao antígeno) da proteína ou peptídeo original. Por exemplo, a substituição pode ser uma substituição conservativa.

[0122] No presente pedido, o homólogo pode ser uma proteína ou peptídeo que apresenta pelo menos cerca de 85 % (por exemplo, pelo menos cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou mais) homologia de sequência com a sequência de aminoácidos da proteína e/ou peptídeo (por exemplo, o anticorpo ou o fragmento do mesmo que se liga especificamente à proteína CD38).

[0123] No presente pedido, a homologia refere-se usualmente à similaridade, analogia ou associação entre duas ou mais sequências. A “porcentagem de homologia de sequência” pode ser calculada como seguir: as duas sequências a serem alinhadas são comparadas na janela de comparação, para determinar o número de posições com a mesma base de ácido nucleico (por exemplo, A, T, C, G, I) ou o mesmo resíduo de aminoácido (por exemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys e Met) em duas sequências para obter o número de posições correspondentes. O número das posições correspondentes é dividido pelo

número total de posições na janela de comparação (isto é, o tamanho da janela), e o resultado é multiplicado por 100 para produzir a porcentagem de homologia de sequência. O alinhamento para determinar a porcentagem de homologia de sequência pode ser realizado de acordo com vários métodos que são conhecidos na técnica, tais como, o uso de software de computador disponível ao público, tal como, os softwares BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Técnicos no assunto podem determinar os parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, compreendendo qualquer algoritmo necessário para obter o alinhamento máximo dentro do escopo de sequência de comprimento total sendo comparado ou dentro da área de sequência de destino. A homologia também pode ser determinada pelo seguinte método: FASTA e BLAST. Para a descrição do algoritmo FASTA, pode ser consultado W. R. Pearson e D. J. Lipman's "Improved Tools for Biological Sequence Comparison", Proceedings of the National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444 a 2448, 1988; e D. J. Lipman e W. R. Pearson's "Lip Fast and Sensitive Prote similarity Search", Science, 227: 1435 a 1441, 1989. Para a descrição do algoritmo BLAST, pode ser consultado S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers e D. Lipman, "A Basic Local Alignment Search Tool", Journal of Molecular Biology, 215: 403 a 410, 1990.

ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA E MÉTODO DE PREPARAÇÃO

[0124] Em outro aspecto, o presente pedido fornece adicionalmente uma ou mais moléculas de ácido nucleico isoladas. Uma ou mais moléculas de ácido nucleico podem compreender um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com o presente pedido. Por exemplo, o polinucleotídeo em uma ou mais moléculas de ácido nucleico pode codificar o anticorpo inteiro ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, e também pode codificar uma porção do mesmo (por exemplo, um ou mais de HCDR1-3, LCDR1-3, VL, VH, cadeia leve ou cadeia pesada).

[0125] Pelo menos uma entre as moléculas de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico do presente pedido pode ser otimizada no códon. Por exemplo, o método de otimização de códons compreende, mas não é limitado a: eliminar códons raros, ajustar o conteúdo de GC, aumentar a estabilidade de mRNA, ajustar a estrutura secundária de mRNA, projetar racionalmente o ligante e ajustar o ambiente inicial do códon.

[0126] Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico pode compreender uma ou mais sequências de polinucleotídeos selecionadas a partir do grupo que compreende as SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14. Em que a SEQ ID NO: 9 pode codificar a região variável de cadeia leve do anticorpo SG003 do presente pedido. A SEQ ID NO: 10 pode codificar a região variável de cadeia pesada do anticorpo SG003 do presente pedido. A SEQ ID NO: 12 pode codificar a cadeia leve do anticorpo SG003 do presente pedido. A SEQ ID NO: 14 pode codificar a cadeia pesada do anticorpo SG003 do presente pedido.

[0127] A molécula de ácido nucleico do presente pedido pode ser isolada. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico pode ser produzida ou sintetizada pelos seguintes métodos: (i) a molécula de ácido nucleico pode ser amplificada *in vitro*, tal como, produzida pela amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR), (ii) a molécula de ácido nucleico pode ser produzida por clonagem e recombinação, (iii) a molécula de ácido nucleico pode ser purificada, tal como, separada por digestão e fracionamento eletroforético em gel, ou (iv) a molécula de ácido nucleico pode ser sintetizada, tal como, por síntese química. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico isolado é uma molécula de ácido nucleico preparada por uma tecnologia de DNA recombinante.

[0128] No presente pedido, o ácido nucleico que codificar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser preparado através de vários métodos conhecidos na técnica. Estes métodos compreendem, mas não se limitam a,

operação restritiva de fragmentos ou PCR de extensão de sobreposição usando oligonucleotídeos sintéticos, podem se referir ao seguinte para obter detalhes: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; e Ausube *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova Iorque N.Y., 1993.

[0129] Em outro aspecto, o presente pedido fornece um ou mais vetores que compreendem uma ou mais moléculas de ácido nucleico do presente pedido. Cada vetor pode compreender uma ou mais moléculas de ácido nucleico. Além disso, o vetor pode compreender adicionalmente outros genes, tais como, um gene marcador que permite selecionar o vetor em células apropriadas e sob condições apropriadas. Além disso, o vetor pode compreender adicionalmente um elemento de controle de expressão que permite que a codificação da região a ser expressada apropriadamente em um hospedeiro apropriado. Tal elemento de controle é bem conhecido por técnicos no assunto, tal como, o elemento de controle pode compreender o promotor, o sítio de ligação do ribossomo, o acentuador e outros elementos de controle que ajustam a transcrição gênica ou a tradução de mRNA, etc. Em algumas formas de realização, a sequência de controle de expressão é um elemento ajustável. A estrutura específica da sequência de controle de expressão pode variar dependendo das funções de espécie ou tipos de células, mas usualmente compreende a sequência 5' não transcrita e 5' e 3' não traduzidas envolvidas na iniciação da transcrição e tradução, tais como, caixa TATA, sequência de capeamento, sequência CAAT, etc. Por exemplo, a sequência de controle de expressão não transcrita 5' pode compreender uma região promotora, e a região promotora pode compreender uma sequência promotora para controlar transcricionalmente um ácido nucleico de ligação funcional. A sequência de controle de expressão também pode compreender uma sequência acentuadora ou uma sequência ativadora a montante. Uma ou mais moléculas de

ácido nucleico do presente pedido podem estar operacionalmente ligadas ao elemento de controle de expressão.

[0130] O vetor pode compreender, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, vírus, bacteriófagos ou outros vetores comumente usados em, por exemplo, engenharia genética. Por exemplo, o vetor é um vetor de expressão. Por exemplo, o vetor de expressão pode ser T-easy.

[0131] Em outro aspecto, o presente pedido fornece uma célula que pode compreender uma ou mais das moléculas de ácido nucleico do presente pedido e/ou um ou mais vetores do presente pedido. Em algumas formas de realização, cada um ou cada tipo de célula pode compreender um ou um tipo de molécula de ácido nucleico ou vetor do presente pedido. Em algumas formas de realização, cada um ou cada tipo de célula pode compreender mais de um (por exemplo, dois ou mais) ou mais do que um tipo de (por exemplo, dois ou mais tipo de) moléculas de ácido nucleico ou vetores do presente pedido. Por exemplo, o vetor do presente pedido pode ser introduzido em uma célula, tal como, células eucarióticas, tal como células derivadas de plantas, células fúngicas ou leveduras, etc. O vetor do presente pedido pode ser introduzido na célula por um método conhecido na técnica, tal como, eletroporação, transfecção de lipofectina, transfecção de lipofectamina, etc. Por exemplo, a célula pode ser CHO-S.

[0132] Em outro aspecto, o presente pedido fornece um método para preparar um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. O método pode compreender a cultura da célula do presente pedido sob condições que permitem expressar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Por exemplo, é possível usar meios de cultura apropriados, temperatura e tempo de incubação apropriados e assim por diante. Estes métodos são conhecidos por técnicos no assunto.

[0133] Em alguns casos, o método pode compreender adicionalmente uma

etapa de isolamento e/ou purificação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Por exemplo, a proteína G-agarose ou a proteína A-agarose pode ser usada para cromatografia de afinidade, e anticorpos em gel e/ou cromatografia líquida de alto desempenho e semelhantes também podem ser usados para purificar e isolar os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do presente pedido. Por exemplo, a proteína A também pode ser usada.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, APLICAÇÃO

[0134] Em outro aspecto, o presente pedido fornece uma composição farmacêutica que pode compreender o anticorpo, um fragmento de ligação ao anticorpo ou uma variante do presente pedido, uma molécula de ácido nucleico, um vetor ou uma célula e um adjuvante farmacêuticamente aceitável opcionalmente.

[0135] O adjuvante farmacêuticamente aceitável pode compreender tampões, antioxidantes, conservantes, peptídeos de baixo peso molecular, proteínas, polímeros hidrofílicos, aminoácidos, açúcares, agentes quelantes, contra-íons, complexos metálicos e/ou tensoativos não iônicos, etc.

[0136] No presente pedido, a composição farmacêutica pode ser formulada para administração oral, administração intravenosa, administração intramuscular, administração *in situ* no sítio do tumor, inalação, administração retal, administração vaginal, administração transdérmica ou administração por depósito subcutâneo.

[0137] A composição farmacêutica pode ser usada para inibir o crescimento do tumor. Por exemplo, a composição farmacêutica do presente pedido pode inibir ou aliviar o desenvolvimento ou progressão de doenças, reduzir o tamanho do tumor (ou mesmo eliminar basicamente o tumor), e/ou reduzir e/ou estabilizar o estado da doença.

[0138] A composição farmacêutica do presente pedido pode compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. A quantidade terapêuticamente eficaz pode ser uma dose

necessária para prevenir e/ou tratar (pelo menos tratar parcialmente) um transtorno ou condição (por exemplo, câncer) e/ou quaisquer complicações em um indivíduo com ou em risco de desenvolvimento do transtorno ou condição.

[0139] Por outro lado, o presente pedido fornece uma aplicação do anticorpo ou de um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo na preparação de medicamentos para prevenir ou tratar tumores.

[0140] Por outro lado, o presente pedido fornece um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para prevenir ou tratar tumores.

[0141] Por outro lado, o presente pedido fornece um método para prevenir ou tratar tumores. O método compreende administrar a um indivíduo em necessidade o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, o ácido nucleico molecular, o vetor, a célula e/ou a composição farmacêutica no presente pedido.

[0142] No presente pedido, os tumores podem compreender um tumor CD38 positivo. Por exemplo, o tumor CD38 positivo pode ser selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

[0143] Em algumas formas de realização, o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[0144] Por outro lado, o presente pedido fornece um método para inibir a ligação de proteína CD38 ao ligante CD38, e o método compreende administrar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a molécula de ácido nucleico, o vetor e/ou a célula no presente pedido.

[0145] No presente pedido, o ligante CD38 pode compreender uma proteína CD31.

[0146] Em algumas formas de realização, o método para inibir a ligação de proteína CD38 ao ligante CD38 é um método *in vitro* ou *ex vivo*.

[0147] O presente pedido pode compreender a seguinte forma de realização:

1. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se

liga a uma proteína CD38 em um valor de K_D de 1×10^{-9} M ou menor.

2. O anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 1, que pode matar e danificar células tumorais e/ou inibir o crescimento do tumor por meio de ligação específica à proteína CD38.

3. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 2, que pode matar células CD38⁺ por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose.

4. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 3, em que os tumores compreendem um tumor CD38 positivo.

5. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 4, em que o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

6. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 3 a 5, em que o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

7. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 3 a 6, em que as células tumorais compreendem aquelas selecionadas a partir do grupo que compreende célula Raji, célula Daudi, célula Ramos e célula RPMI8226.

8. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 7, que se liga a um ou mais resíduos correspondentes aos resíduos de aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 humana quando se liga à proteína CD38.

9. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 8, em que o anticorpo é

selecionado a partir do grupo que compreende anticorpo monoclonal, anticorpo de cadeia única, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e anticorpo completamente humano.

10. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 9, em que o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir do grupo que compreende os fragmentos Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv e ScFv.

11. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 10, em que a proteína CD38 é proteína CD38 humana ou proteína CD38 de macaco.

12. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 11, que compete com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38, em que o anticorpo de referência compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve do anticorpo de referência compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3, a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1; a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2; a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3, a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3, a HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4; a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5; e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

13. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 12, em que a região variável de cadeia leve do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7, e a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência compreende uma

sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

14. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 12 a 13, em que a cadeia leve do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22; e a cadeia pesada do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23.

15. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 14, que compete com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38, em que o anticorpo de referência compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20; e a cadeia pesada do anticorpo de referência compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

16. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 15, em que o anticorpo compreende a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo.

17. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 16, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR1, e a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1.

18. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 16 a 17, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR2, e a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2.

19. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo

com qualquer uma das formas de realização de 16 a 18, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR3, e a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3.

20. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 16 a 19, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve VL, e a região variável de cadeia leve VL compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7.

21. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 16 a 20, em que a cadeia leve do anticorpo ou um fragmento do mesmo compreende adicionalmente a região constante humana.

22. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 21, em que a região constante humana compreende um região constante de Igk humana.

23. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 16 a 22, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 22.

24. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 27, em que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

25. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 24, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada do anticorpo ou de um fragmento do mesmo.

26. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo

com a forma de realização 25, em que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR1, e a HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4.

27. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 25 a 26, em que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR2, e a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 5.

28. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 25 a 27, em que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR3, e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6.

29. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 25 a 28, em que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada VH, e a região variável de cadeia pesada VH compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8.

30. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 25 a 29, em que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende ainda uma região constante humana.

31. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 30, em que a região constante humana compreende um região constante da IgG humana.

32. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 31, em que a região constante da IgG compreende um região constante da IgG1 humana.

33. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo

com qualquer uma das formas de realização de 25 a 32, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 23.

34. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 33, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

35. Uma ou mais moléculas de ácido nucleico isoladas, compreendendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34.

36. A molécula de ácido nucleico, de acordo com a forma de realização 35, em que pelo menos uma entre as moléculas de ácido nucleico é otimizada no códon.

37. A molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 36, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma ou mais sequências de polinucleotídeos selecionadas a partir do grupo que compreende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14.

38. Um vetor, compreendendo a molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 37.

39. Uma célula, compreendendo a molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 37, ou o vetor, de acordo com a forma de realização 38.

40. Um método para preparar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34, compreendendo cultivar a célula, de acordo com a forma de realização 39, sob condições que permitam expressar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

41. Uma composição farmacêutica, compreendendo o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas

de realização de 1 a 34, a molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 37, o vetor, de acordo com a forma de realização 38, ou a célula, de acordo com a forma de realização 39 e, opcionalmente, um adjuvante farmacologicamente aceitável.

42. Uma aplicação do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34, na preparação de medicamentos para prevenir ou tratar tumores.

43. A aplicação, de acordo com a forma de realização 42, em que os tumores compreendem um tumor CD38 positivo.

44. A aplicação, de acordo com a forma de realização 43, em que o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

45. A aplicação, de acordo com formas de realização 42 a 44, em que o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

46. Um anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34, para prevenir ou tratar tumores.

47. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 46, em que os tumores compreendem um tumor CD38 positivo.

48. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a forma de realização 47, em que o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

49. A aplicação, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 46 a 48, em que o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

50. Um método para prevenir ou tratar tumores em um indivíduo em

necessidade do mesmo, compreendendo administrar, ao indivíduo, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34, a molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 37, o vetor, de acordo com a forma de realização 38, a célula, de acordo com a forma de realização 39, e/ou a composição farmacêutica, de acordo com a forma de realização 40.

51. O método, de acordo com a forma de realização 50, em que os tumores compreendem um tumor CD38 positivo.

52. O método, de acordo com a forma de realização 51, em que o tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

53. O método, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 50 a 52, em que o tumor é selecionado a partir do grupo que compreende linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

54. Um método para inibir a ligação de uma proteína CD38 a um ligante CD38, compreendendo administrar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 34, a molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 37, o vetor, de acordo com a forma de realização 38, e/ou a célula, de acordo com a forma de realização 39.

55. O método, de acordo com a forma de realização 54, em que o ligante CD38 compreende CD31.

[0148] Sem limitar a invenção a qualquer teoria, os exemplos seguintes são apenas para explicar o modo de trabalho dos produtos, métodos ou sistemas do presente pedido, mas não pretendem limitar o escopo da invenção do presente pedido.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação de Anticorpo de Hibridoma e Clonagem de Genes

[0149] Imunização de camundongos: Camundongos balb/c (adquiridos a partir da Beijing Vital Riveja Labs Animal Technology Co., Ltd.) foram subcutaneamente (s.c.) imunizados por 3 vezes com adjuvante de Freund ou adjuvante incompleto de Freund misturado com 100 µg de antígeno CD38 solúvel (adquirido a partir da Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.). No Dia 0, o adjuvante completo de Freund foi usado, e no Dia 14 e Dia 28, o adjuvante incompleto de Freund foi usado. Células do baço dos camundongos imunizados foram fundidas às células de mieloma de camundongo SP2/0 (ATCC), de acordo com um método padrão.

[0150] Fusão de hibridoma: os baços de camundongos foram fundidos, de acordo com o método de fusão de hibridoma convencional atual, e as células de hibridoma fundidas (10^5 células por poço) foram triadas, de acordo com o método de triagem HAT. Depois de 12 dias, o sobrenadante foi submetido ao ensaio ELISA com uma microplaca revestida com o antígeno CD38. Os clones preferidos foram submetidos à segunda rodada de subclonagem por limitação da análise de diluição. A cepa de hibridoma obtida que expressa de forma estável o anticorpo de interesse foi submetida à preservação de sementes e construção de biblioteca.

[0151] Preparação de RNA: O RNA foi preparado usando um kit de extração de RNA TRIzol Reagent (adquirido a partir da Life technologies). Um kit de transcrição reversa (adquirido a partir da Beijing Quanshijin Biotechnology Co., Ltd.) foi usado para preparar o cDNA que codifica o gene de anticorpo, e o cDNA foi usado como um molde para a amplificação por PCR do gene da região variável do anticorpo. O vetor T-easy foi clonado e as sequências da região variável de cadeia pesada e cadeia leve obtidas depois da clonagem foram sequenciadas, de modo a obter adicionalmente as sequências de aminoácidos correspondentes.

Exemplo 2: Humanização e Preparação do Anticorpo

[0152] As sequências de cadeia pesada e leve das regiões variáveis do anticorpo murino obtidas no Exemplo 1 foram submetidas ao alinhamento de sequência com as sequências de anticorpo humano existentes no banco de dados NCBI por intermédio do método de alinhamento de sequência online (IgBlast) fornecido pelo NCBI, para determinar os sítios humanizados potenciais. Além disso, uma estrutura tridimensional da região variável do anticorpo murino foi construída por intermédio de SwissModel, para determinar os sítios humanizados. Com respeito aos sítios humanizados correspondentes, a humanização foi realizada para obter a sequência do anticorpo humanizado.

[0153] O anticorpo humanizado foi denominado SG003 e os resultados do sequenciamento mostraram que as sequências de aminoácidos de LCDR1 a 3 do anticorpo SG003 são mostradas na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, respectivamente; a sequência de aminoácidos de VL é mostrada na SEQ ID NO: 7; a sequência de nucleotídeos que codifica VL obtida pela otimização do códon e tradução reversa é mostrada na SEQ ID NO: 9; as sequências de aminoácidos de HCDR1 a 3 do anticorpo SG003 são mostradas na SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, respectivamente; a sequência de aminoácidos de VH é mostrada na SEQ ID NO: 8; e a sequência de nucleotídeos que codifica VH obtida pela otimização do códon e tradução reversa é mostrada na SEQ ID NO: 10.

[0154] A sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo SG003 é mostrada na SEQ ID NO: 11; e a sequência de nucleotídeos que codifica para tal é mostrada na SEQ ID NO: 12. A sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo SG003 é mostrada na SEQ ID NO: 13; e a sequência de nucleotídeos que codifica para tal é mostrada na SEQ ID NO: 14.

[0155] Os genes da região variável do anticorpo humanizado obtidos foram clonados em um vetor de expressão eucariótico pCMV-163 contendo o gene da região constante da IgG humana, para construir um vetor de expressão de anticorpo

completo com um mapa físico mostrado na Fig. 1. Na Fig. 1, vários componentes do vetor de expressão eucariótico pCMV-163 são conhecidos na técnica e recombinações na ordem mostrada.

[0156] Um kit ExpiCHO™ Expression System (adquirido a partir da Thermo Fisher Scientific) foi usado para transfectar o vetor de expressão eucariótico obtido que codifica o anticorpo SG003 em células CHO-S para expressão e o sobrenadante de cultura celular contendo a proteína de interesse foi coletado. O anticorpo alvo foi purificado usando a purificação de afinidade da proteína A convencional.

Exemplo 3: Ligação do Anticorpo Humanizado ao Antígeno Alvo

[0157] Uma placa de ELISA foi revestida com uma solução PBS contendo 1 µg/ml de CD38-His proteína de fusão a 4 °C durante a noite. A placa depois foi lavada com uma solução PBS contendo Tween-20 0,01 % (PBST). Soro fetal bovino 10 % foi adicionado ao PBST e bloqueado a 37 °C durante 1 hora. Depois, concentrações diferentes do anticorpo SG003 e de um anticorpo controle Daratumumabe (DARZALEX) foram adicionadas e reagidas a 37 °C durante 1 hora. Depois da lavagem com PBST, anticorpos secundários IgG HRP anti-humanos de cabra marcados com peroxidase de raiz forte (adquiridos a partir da Thermo Fisher Scientific) foram adicionados e reagidos a 37 °C durante 30 minutos. Depois, a placa foi lavada com PBST (5 vezes) e as gotas de líquido residual foram removidas o máximo possível em um papel absorvente. 100 µl de TMB (adquiridos a partir da eBioscience) foram adicionados a cada poço e colocados na temperatura ambiente (20 ± 5 °C) no escuro durante 1 a 5 minutos. 100 µl de solução de parada H₂SO₄ 2 N foram adicionados a cada poço para extinguir a reação do substrato. O valor de OD foi lido em 450 nm com um leitor de microplaca e a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno alvo CD38-His foi analisada. Os resultados mostram que o anticorpo SG003 mostrou uma atividade de ligação mais forte do que o anticorpo controle Daratumumabe e os resultados são mostrados na Fig. 2. Na Fig. 2, o valor de EC₅₀ é de 35,1 ± 10,5 ng/mL,

enquanto o valor de EC50 do anticorpo Daratumumabe é de $150,9 \pm 105,8$ ng/mL.

Exemplo 4: Determinação da Afinidade do Anticorpo Humanizado

[0158] A afinidade do anticorpo foi analisada pelo BIACORE Biomacromolecule Interaction Apparatus (GE). O anticorpo IgG-Fab anti-humano (adquirido a partir da Abcam) foi ligado ao chip e o anticorpo IgG anti-humano foi usado para capturar o anticorpo SG003. A concentração do anticorpo foi ajustada a $1 \mu\text{g/mL}$, o tempo de injeção foi de 60 a 150 segundos; o antígeno CD38 foi usado como a fase móvel; 6 gradientes de concentração (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 nM) foram usados, o tempo de associação foi de 120 segundos; o tempo de dissociação foi de 1200 segundos; tampão glicina-ácido clorídrico 10 mM (pH 2,1) foi usado para a regeneração durante 60 segundos. Os resultados mostram que a afinidade do anticorpo SG003 foi mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Afinidade do Anticorpo SG003

Anticorpo	Constante de Associação (10^6 1/Ms)	Constante de Dissociação (10^{-4} 1/s)	Afinidade Relativa (10^{-10} M)
SG003	$2,86 \pm 0,00$	$9,18 \pm 0,01$	$3,21 \pm 0,01$

Exemplo 5: Reconhecimento Específico do Anticorpo Humanizado sobre o Antígeno Alvo

[0159] Várias proteínas, tais como leite (Beijing Bomed Biotechnology Co., Ltd.), BSA (BOVOGEN), CD19 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), TROP2 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), CD47 (Beijing Magpel Biotech Technology Co., Ltd.), CD38 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), Gas6 (R&D) e AXL (ACRO Biosystems), foram respectivamente usadas para revestir tiras de ELISA em 1 mg/ml a 4°C durante a noite. Depois da lavagem com PBST, soro fetal bovino 10 % foi adicionado e bloqueado a 37°C durante 1 hora. O

anticorpo SG003 foi adicionado e reagido a 37 °C durante 1 hora. Depois da lavagem com PBST, anticorpos secundários IgG HRP anti-humanos de cabra marcados com peroxidase de raiz forte (adquiridos a partir da ThermoFisher Scientific) foram adicionados e reagidos na temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois da lavagem da placa com PBST (5 vezes), as gotas residuais foram removidas o máximo possível no papel absorvente. TMB 100 ml (eBioscience) foi adicionado a cada poço e colocado na temperatura ambiente (20±5 °C) no escuro durante 1 a 5min. 100 ml de solução de parada H₂SO₄ 2 N foram adicionados a cada poço para extinguir a reação do substrato e o valor de OD foi lido em 450 nm com um leitor de microplaca para analisar a capacidade de ligação anticorpo-proteína.

[0160] Os resultados são mostrados na Fig. 3. Os resultados na Fig. 3 mostram que o anticorpo SG003 pode reconhecer especificamente o antígeno alvo CD38, mas não apresenta reação de ligação significativa com leite, BSA, CD19, TROP2, CD47, AXL, Gas6 e outras proteínas.

Exemplo 6: Ligação do Anticorpo Humanizado ao Antígeno sobre a Superfície Celular

[0161] A tecnologia de análise de fluxo foi usada para detectar a ligação de proteínas CD38 sobre as superfícies de células Raji, células Daudi, células Ramos e células RPMI8226 ao anticorpo SG003 e ao anticorpo controle Daratumumab. As células da fase de crescimento logarítmica foram coletadas, ajustadas a uma densidade celular de 5 x 10⁶ células/mL e pré-esfriadas em gelo. O anticorpo SG003 e o anticorpo controle Daratumumabe foram diluídos em concentrações diferentes com solução salina normal pré-esfriada contendo FBS 2 %. 100 µL de células foram coletados e um volume igual do anticorpo diluído foi adicionado para a reação a 4 °C durante 30 min no escuro. Depois da conclusão da reação, as células foram lavadas duas vezes. As células foram recolocadas em suspensão em 100 µL dos anticorpos secundários IgG anti-Humanos de camundongo PE diluídos (adquiridos a partir da BD

Pharmingén) e reagidas a 4 °C no escuro durante 30 min. Depois da conclusão da reação, as células foram lavadas duas vezes com uma solução salina normal pré-esfriada contendo FBS 2 %. As células foram recolocadas em suspensão em 400 µL de paraformaldeído 1 %. Citometria de fluxo (BD Calibur) foi usada para analisar a capacidade de ligação dos anticorpos aos antígenos de superfície celular.

[0162] Os resultados mostram que o anticorpo SG003 pode reconhecer especificamente a CD38 sobre as superfícies de células Raji, células Daudi, células Ramos e células RPMI8226. Esta atividade de reconhecimento é significativamente maior do que aquela do anticorpo controle Daratumumabe em uma maneira dependente da dose e o valor de EC50 de SG003 combinada com células Raji (Fig. 4A) foi de 34,4 ng/mL, e Daratumumabe foi de 49,3 ng/mL. O valor de EC50 de SG003 combinada com células Daudi (Fig. 4B) foi de 36,7 ng/mL, e Daratumumabe foi de 50,9 ng/mL. O valor de EC50 de SG003 combinada com células Ramos (Fig. 4C) foi de 81,5 ng/mL, e Daratumumabe foi de 95,1 ng/mL. O valor de EC50 de SG003 combinada com células RPMI8226 (Fig. 4D) foi de 140,3 ng/mL, e Daratumumabe foi de 176,5 ng/mL.

Exemplo 7: Atividade de Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpos (ADCC) do Anticorpo Humanizado

[0163] Primeiro, as células alvo (células Raji, células Daudi, células Ramos e células RPMI8226) exigidas para o experimento foram ajustadas a uma densidade de 2×10^5 células/mL, recolocadas em suspensão em um tampão ADCC (meio MEM sem vermelho de fenol + FBS 1 %) e adicionadas a uma placa de 96 poços (50 µL/poço). Depois, 100 µL de anticorpo SG003 de concentrações diferentes foram adicionados a cada poço, misturados homogeneamente e incubados a 37 °C em uma incubadora contendo CO₂ 5 % durante 30 minutos. Depois, as células efectoras exigidas NK92MI-CD16a (adquiridas a partir da Huabo Bio) foram ajustadas a uma densidade de $1,2 \times 10^6$ célula/mL e adicionadas aos poços com as células alvo, tal que uma razão de

células alvo para células efectoras foi igual a 1:6. Depois da mistura, a mistura foi incubada a 37 °C durante 4 a 6 h em uma incubadora contendo CO₂ 5 % e, depois, uma porção da solução estoque (100 µL/poço) na placa de 96 poços foi removida e a mistura de reação LDH em um kit de detecção de LDH (Kit de Detecção de Citotoxicidade, adquirido a partir da Roche) (100 µL/poço) foi adicionada em cada poço. A mistura foi reagida a 37 °C durante 10 min. Depois, uma solução de parada (50 µL/poço) foi adicionada e misturada suavemente. O valor de OD foi lido em 492 nm com um leitor de microplaca e o valor de OD em 650 nm foi usado como o valor de fundo. No experimento, os seguintes grupos controle também foram ajustados: em que, o controle 1 foi tampão ADCC, o controle 2 foi células alvo + tampão ADCC, o controle 3 foi células alvo + lisato + tampão ADCC e o controle 4 foi células alvo + células efectoras + tampão ADCC líquido. % de Taxa de morte específica = ((Grupo Experimental-Controle 4)/(Controle 3-Controle 2)) x 100 %. A curva dose-efeito foi submetida à análise de dados pelo GraphPad Prism Versão 5.

[0164] Os resultados mostram que quando testado com células alvo Raji e células efectoras NK92MI-CD16a, o anticorpo SG003 mostrou uma atividade de ADCC muito eficaz (veja a Fig. 5A), com um valor de EC₅₀ de SG003 de 6,97 ng/mL e de Daratumumabe de 17,0 ng/mL. Quando Daudi foi usada como uma célula alvo, o valor de EC₅₀ de SG003 foi de 0,72 ng/mL e de Daratumumabe foi de 4,6 ng/mL (consultar a Fig. 5B). Ao mesmo tempo, o anticorpo SG003 também mostrou uma atividade de ADCC eficaz sobre as células Ramos (consultar a Fig. 5C). O valor de EC₅₀ de SG003 foi de 0,69±0,007 ng/mL e de Daratumumabe foi de 3,01 ng/mL. O anticorpo SG003 também mostrou uma atividade de ADCC eficaz contra células RPMI8226 (consultar a Fig. 5D), com um valor de EC₅₀ de SG003 de 1,46 ng/mL e de Daratumumabe de 4,94 ng/mL.

Exemplo 8: Inibição *In Vivo* do Anticorpo Humanizado sobre a Atividade do Tumor

[0165] O modelo do tumor foi estabelecido por meio de inoculação de células Raji-Luc em camundongos CB17 SCID para avaliar o efeito do anticorpo SG003 na inibição da atividade do tumor.

[0166] Camundongos CB17 SCID fêmeas com 5 a 8 semanas de vida (adquiridos a partir da Beijing Biocytogen Co., Ltd.) foram selecionados para o experimento. A célula Raji-Luc é uma linhagem celular estável obtida a partir da Beijing Biocytogen Co., Ltd. Com base na célula Raji, que é transformada com gene repórter da luciferina. Depois de ressuscitar e cultivar até o número exigido, células de crescimento de fase logarítmica foram coletadas e colocadas em suspensão em uma concentração de 5×10^6 células/0,2 mL. Os camundongos CB17 SCID foram inoculados através da veia da cauda na quantidade de 0,2 mL/camundongo. Depois da inoculação, os camundongos foram observados com um pequeno imageador para animais quanto ao crescimento do tumor e peso corpóreo no Dia 0 e Dia 7. No Dia 7, 18 camundongos com sinais de imageamento de tumor moderado foram selecionados e aleatoriamente distribuídos em 3 grupos, 6 em cada grupo. Depois, os receberam a administração. Um grupo controle solução salina, um grupo controle positivo (Daratumumabe, adquirido a partir da Johnson & Johnson) e um grupo experimental (SG003) foram definidos e a dosagem foi de 200 µg/kg, uma vez a cada duas semanas, um total de duas vezes. Em seguida, os camundongos foram observados quanto ao peso corpóreo, crescimento do tumor e taxa de sobrevivência.

[0167] Os resultados mostram que os anticorpos Daratumumabe e SG003 podem ser tolerado por animais experimentais. Os animais administrados em cada grupo apresentaram um efeito inibitório do crescimento do tumor significativo em comparação ao grupo controle solvente (consultar a Fig. 6). No Dia 7 depois da primeira administração, a intensidade de fluorescência média dos grupos de tratamento com anticorpo Daratumumabe e SG003 foram, respectivamente, (média $3,92E+07$, erro padrão $4,04E+06$), (média $3,19E+07$, erro padrão: $9,32E+06$),

significativamente menores do que a intensidade média de fluorescência do tumor do grupo controle (média $3,04E+08$, erro padrão $4,29E+07$).

[0168] Depois, a taxa de sobrevivência dos animais foi ainda observada. O tempo médio de sobrevivência do grupo controle foi de 12 dias depois do agrupamento, de Daratumumabe foi de 21 dias e do grupo SG003 foi de 28 dias. O grupo SG003 é superior ao grupo Daratumumabe (consultar a Fig. 7).

Exemplo 9: Especificidade de Reconhecimento da Espécie do Anticorpo Quimérico

[0169] As proteínas extracelulares CD38 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.) de espécies diferentes de humanos (Human), camundongos (Mouse), rato (Rat), macaco cinomolgo (Cynomolgus) e semelhantes foram, respectivamente, usadas para revestir tiras de ELISA em 1 mg/ml a 4 °C durante a noite. Depois da lavagem com PBST, soro fetal bovino 10 % foi adicionado e bloqueado a 37 °C durante 1 hora. O anticorpo SG003 a ser testado e o anticorpo controle Daratumumabe foram adicionados, respectivamente, e reagidos a 37 °C durante 1 hora. Depois da lavagem com PBST, anticorpos secundários IgG HRP anti-humanos de cabra marcados com peroxidase de raiz forte (adquiridos a partir da Thermo Fisher Scientific) foram adicionados e reagidos na temperatura ambiente durante 30 minutos. A placa foi lavada com PBST (5 vezes) e as gotas remanescentes foram removidas o máximo possível no papel absorvente. 100 µl de TMB (adquirido a partir da eBioscience) foram adicionados a cada poço e colocados na temperatura ambiente (20 ± 5 °C) no escuro durante 1 a 5 min. 100 µl de solução de parada de H_2SO_4 2 N foram adicionados a cada poço para extinguir a reação do substrato e o valor de OD foi lido em 450 nm com uma microplaca para analisar a capacidade de ligação do anticorpo à proteína CD38 de espécies diferentes.

[0170] Os resultados mostram que o anticorpo SG003 pode reconhecer as moléculas da proteína CD38 de seres humanos e macacos cinomolgos, mas não

apresenta reação de ligação com as moléculas da proteína CD38 de camundongos e ratos; os resultados são mostradas na Fig. 8A.

[0171] O anticorpo controle Daratumumabe apenas reconhece moléculas da proteína CD38 humana e não apresenta reação de ligação com as moléculas da proteína CD38 de camundongos, ratos e macacos cinomolgos. Os resultados são mostradas na Fig. 8B.

Exemplo 10: Manutenção da Atividade Biológica do Anticorpo Humanizado Depois da Mutação

[0172] Com o auxílio da tecnologia de engenharia genética, as sequências da região variável do anticorpo SG003 podem ser aleatoriamente mutadas para obter novas sequências da região variável do anticorpo e ainda obter novas sequências de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo. Por exemplo, para um anticorpo obtido depois da mutação aleatória com base no anticorpo SG003, a sequência de aminoácidos de cadeia leve pode ser a SEQ ID NO: 16 e a sequência de aminoácidos da cadeia pesada pode ser a SEQ ID NO: 17; ou, a sequência de aminoácidos de cadeia leve pode ser a SEQ ID NO: 18, e a sequência de aminoácidos de cadeia pesada pode ser a SEQ ID NO: 19; alternativamente, a sequência de aminoácidos de cadeia leve pode ser a SEQ ID NO: 20 e a sequência de aminoácidos de cadeia pesada pode ser a SEQ ID NO: 21. Os anticorpos contendo a combinação acima da cadeia leve e da cadeia pesada depois da mutação são denominados SG003M1 a 3 em sequência (por exemplo, a sequência de aminoácidos de cadeia leve do anticorpo SG003M1 é a SEQ ID NO: 16 e a sequência de aminoácidos de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 17).

[0173] Um novo anticorpo foi preparado por referência ao método do Exemplo 2 e a atividade do anticorpo foi avaliada por referência ao método do Exemplo 4. O anticorpo SG003M1 a 3 aleatoriamente mutado pode reconhecer o antígeno CD38 (consultar a Fig. 9). Foi determinado que o valor de EC50 de SG003M1 foi de 15,72

ng/mL, o valor de EC50 de SG003M2 foi de 27,75 ng/mL e o valor de EC50 de SG003M3 foi de 6,10 ng/mL. Selecionar aleatoriamente SG003M1 e determinar os resultados de afinidade, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Análise de Afinidade dos Mutantes SG003

Anticorpo	Constante de Associação (10^6 1/Ms)	Constante de Dissociação (10^{-4} 1/s)	Afinidade (10^{-10} M)
SG003M1	2,66 ± 0,01	6,36 ± 0,05	2,39 ± 0,03

Exemplo 11: Verificação do Epítipo do Anticorpo Humanizado

[0174] Um método de mapeamento de epítipos foi usado para analisar o epítipo do anticorpo SG003 que reconheceu o antígeno CD38. Os mutantes do antígeno CD38 (Tabela 3, em que os aminoácidos mutados são todos alanina) foram designados por um método de substituição de alanina e CD38 do tipo selvagem, assim como vários genes mutantes, foram obtidos por reação em cadeia da polimerase (PCR) e extensão de sobreposição (overlap) e outras técnicas de biologia molecular. Depois da separação e recuperação por eletroforese em gel agarose, o anticorpo ou os mutantes foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII e NheI e clonados em um vetor pEGFP-N1. Depois de corrigir o sequenciamento, o Kit HighGene Transfection (ABclonal) foi usado para transfectar o vetor contendo a CD38 do tipo selvagem ou gene mutante em células 293T, de acordo com o método descrito nas instruções do kit. Em 48 horas depois da transfecção, as células foram coletadas por digestão com tripsina para preparar uma suspensão de célula única. As células alvo e o anticorpo SG003 foram incubados em uma concentração de trabalho de 10 µg/ml durante 30 minutos em uma temperatura constante de 4 °C. Depois, GAH-IgG Fc PE (Invitrogen, Cat: 12-4998-82) foi adicionado e incubado em uma temperatura

constante de 4 °C durante 30 minutos e medido quanto à intensidade de fluorescência de canais FITC e PE por citometria de fluxo, em que a intensidade de fluorescência de FITC representa o nível de expressão da molécula de CD38 e seus mutantes e a intensidade de fluorescência de PE representa a concentração do anticorpo SG003 que se liga ao antígeno.

[0175] Os resultados da citometria de fluxo na Fig. 10 mostram que o anticorpo SG003 não se liga aos mutantes 21, 22 e 23, o que sugere que a região do aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 seja o epítipo principal reconhecido pelo anticorpo SG003.

Tabela 3: Mutantes e Sítios de Mutação da Proteína CD38

Nome	Sítio de Mutação
CD38 do Tipo Selvagem	N/A
CD38M4	291 - 300
CD38M5	281 - 290
CD38M6	256 - 266
CD38M7	247 - 255
CD38M8	210 - 219
CD38M9	200 - 209
CD38M10	190 - 199
CD38M11	180 - 189
CD38M12	170 - 179
CD38M13	160 - 169
CD38M14	150 - 159
CD38M15	140 - 149
CD38M16	130 - 139
CD38M17	120 - 129
CD38M18	110 - 119

CD38M19	100 - 109
CD38M20	90 - 99
CD38M21	80 - 89
CD38M22	70 - 79
CD38M23	60 - 69
CD38M24	50 - 59
CD38M25	43 - 49

[0176] A descrição detalhada precedente é fornecida por via de explicação e exemplo e não pretende limitar o escopo das reivindicações anexas. Muitas variações das formas de realização listadas neste relatório são óbvias aos técnicos no assunto e estão no escopo das reivindicações anexas e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que se liga a uma proteína CD38 em um valor de K_D de 1×10^{-9} M ou menor, quando se liga à proteína CD38, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno se liga a um ou mais resíduos correspondentes aos resíduos de aminoácido 60 a 89 da proteína CD38 humana.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir do grupo que compreende anticorpo monoclonal, anticorpo de cadeia única, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e anticorpo completamente humano.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir do grupo que compreende os fragmentos Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv e ScFv.

4. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína CD38 é proteína CD38 humana ou proteína CD38 de macaco.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compete com um anticorpo de referência para se ligar à proteína CD38, em que o anticorpo de referência compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve do anticorpo de referência compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3, a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 1; a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 2; a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 3, a região variável de cadeia pesada do anticorpo de referência compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3, a

HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 4; a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 5; e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 6.

6. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia leve do anticorpo ou um fragmento do mesmo, a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende LCDR1 a 3 que compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3, a LCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 1; a LCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 2; a LCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 3.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve VL e a região variável de cadeia leve VL compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 7.

8. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 22.

9. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia leve do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada em qualquer uma dentre SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

10. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada do anticorpo ou de um fragmento do mesmo, a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3, a HCDR1 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 4; a HCDR2 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 5; e a HCDR3 compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 6.

11. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada VH, e a região variável de cadeia pesada VH compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 8.

12. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia pesada do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada na SEQ ID NO: 23.

13. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia pesada do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos como mostrada em qualquer uma dentre SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 21.

14. Molécula de ácido nucleico isolada **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 14, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma dentre as moléculas de ácido nucleico é otimizada por códons.

16. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 14 ou 15,

CARACTERIZADA pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende uma ou mais sequências de polinucleotídeos selecionadas a partir do grupo que compreende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14.

17. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das reivindicações 14 a 16.

18. Célula **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das reivindicações 14 a 16, ou o vetor, como definido na reivindicação 17.

19. Método para preparar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende cultivar a célula, como definida na reivindicação 18, sob condições que permitam uma expressão do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

20. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, a molécula de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das reivindicações 14 a 16, o vetor, como definido na reivindicação 17, e/ou a célula, como definida na reivindicação 18, e, opcionalmente, um adjuvante farmacologicamente aceitável.

21. Uso do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na preparação de um medicamento para prevenir ou tratar tumores.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os tumores compreendem um tumor CD38 positivo.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito tumor CD38 positivo é selecionado a partir do grupo que compreende mieloma múltiplo, linfoma e leucemia.

24. Método para inibir a ligação de uma proteína CD38 a um ligante de CD38, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, a molécula de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das reivindicações 14 a 16, o vetor, como definido na reivindicação 17, e/ou a célula, como definida na reivindicação 18.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante de CD38 compreende CD31.

Vetor pCMV-163

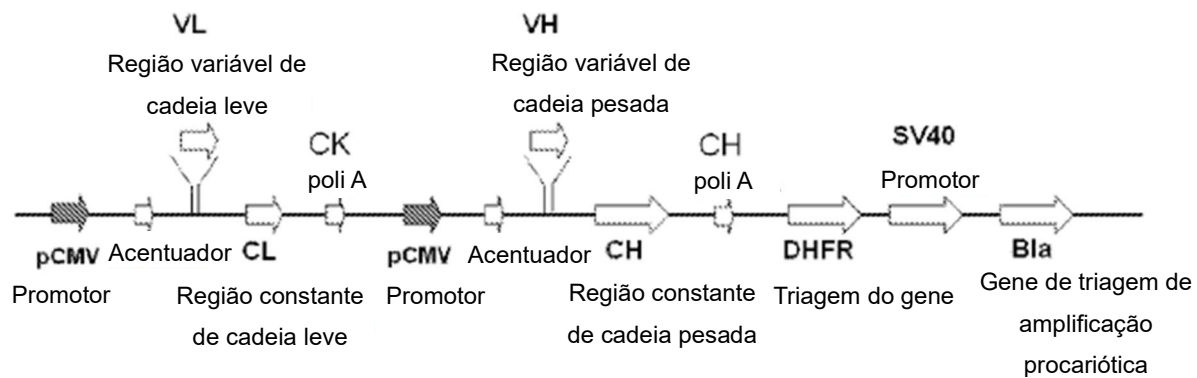


Fig. 1

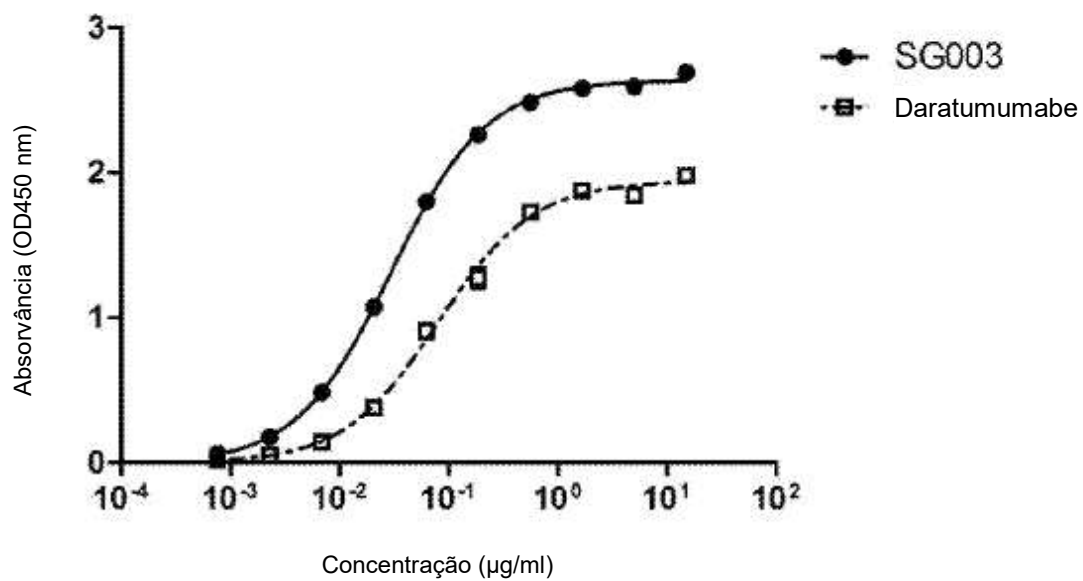


Fig. 2

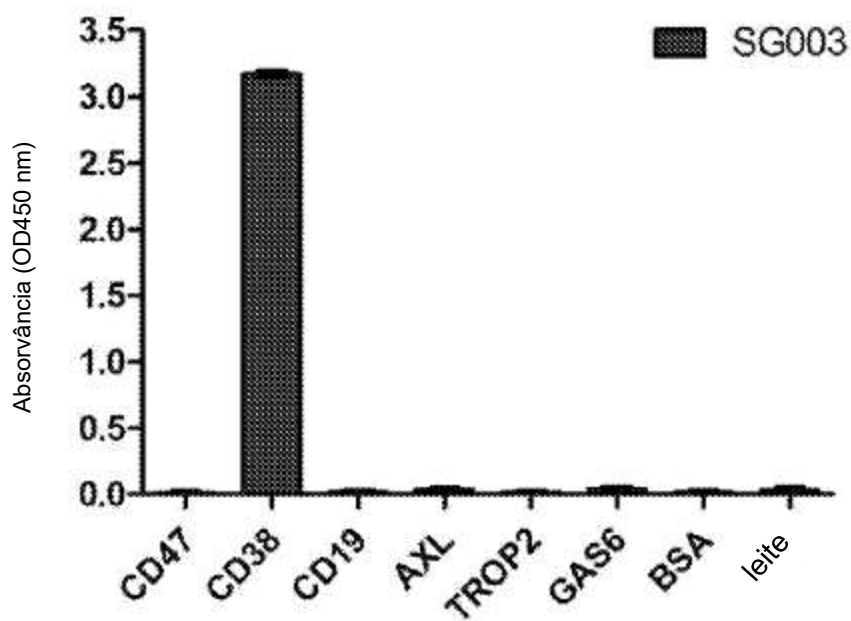


Fig. 3

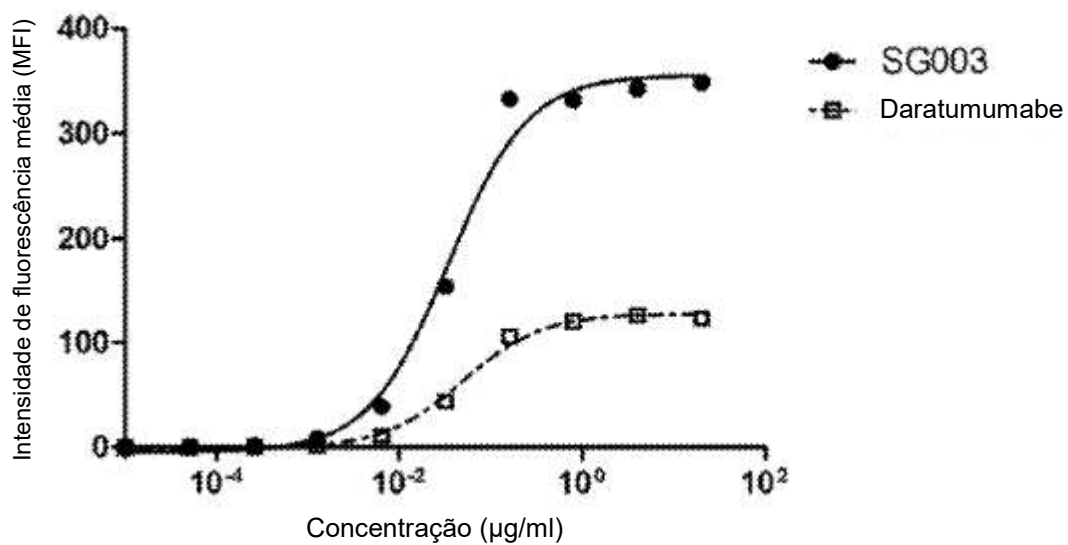


Fig. 4A

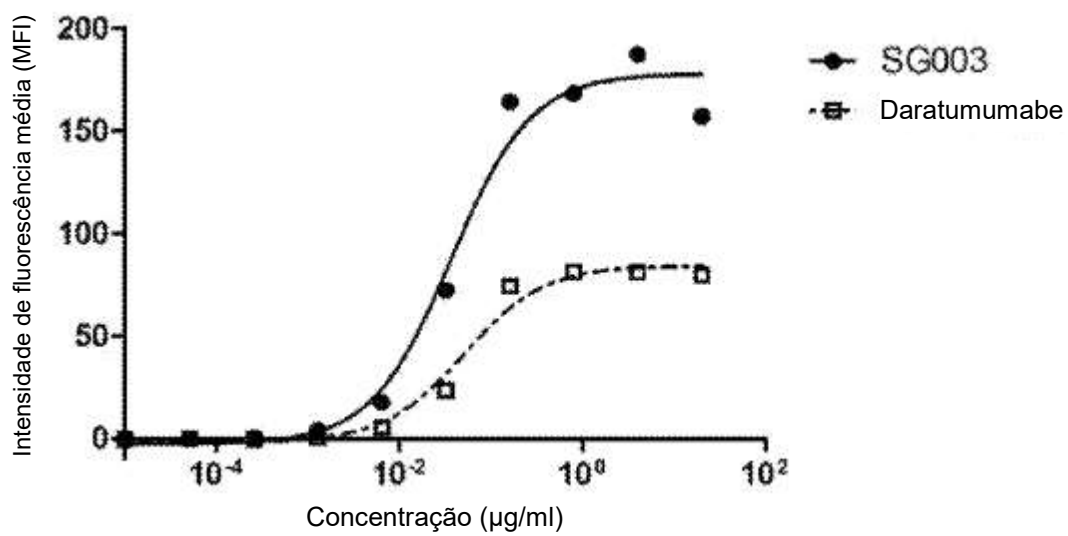


Fig. 4B

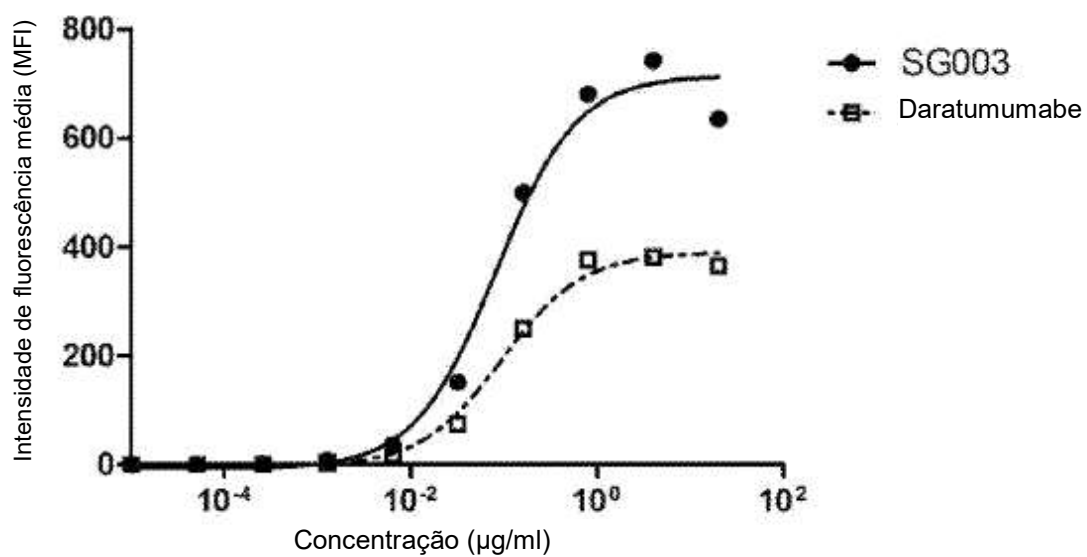


Fig. 4C

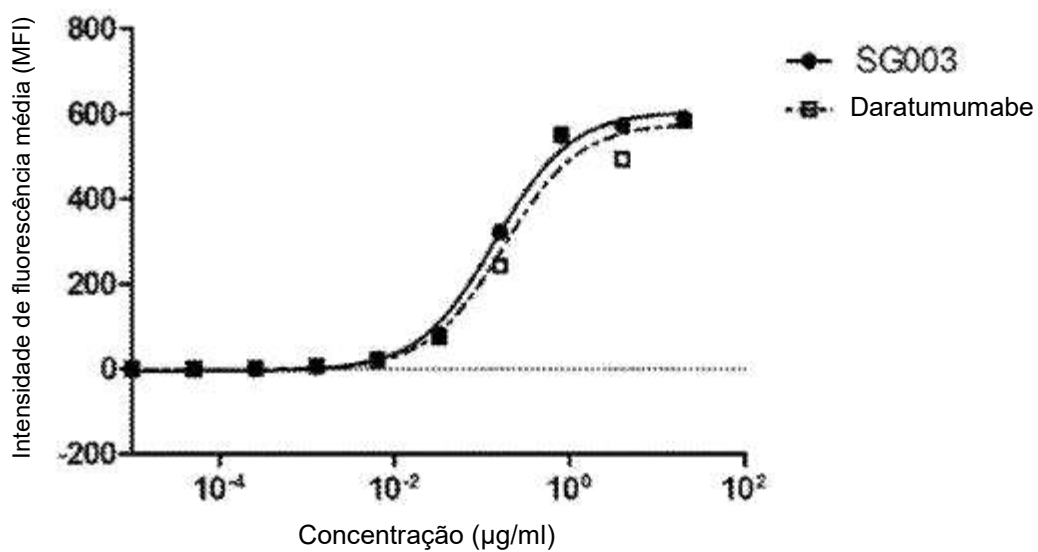


Fig. 4D

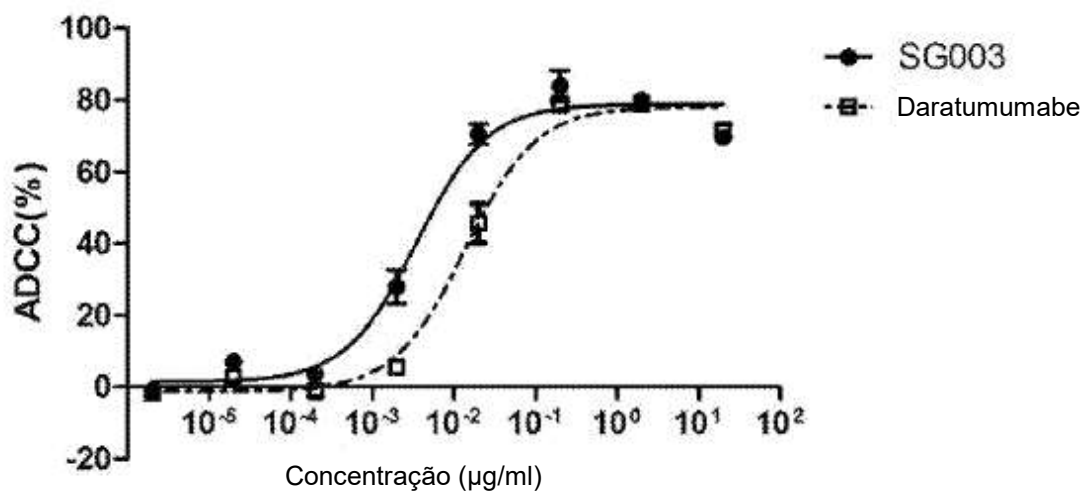


Fig. 5A

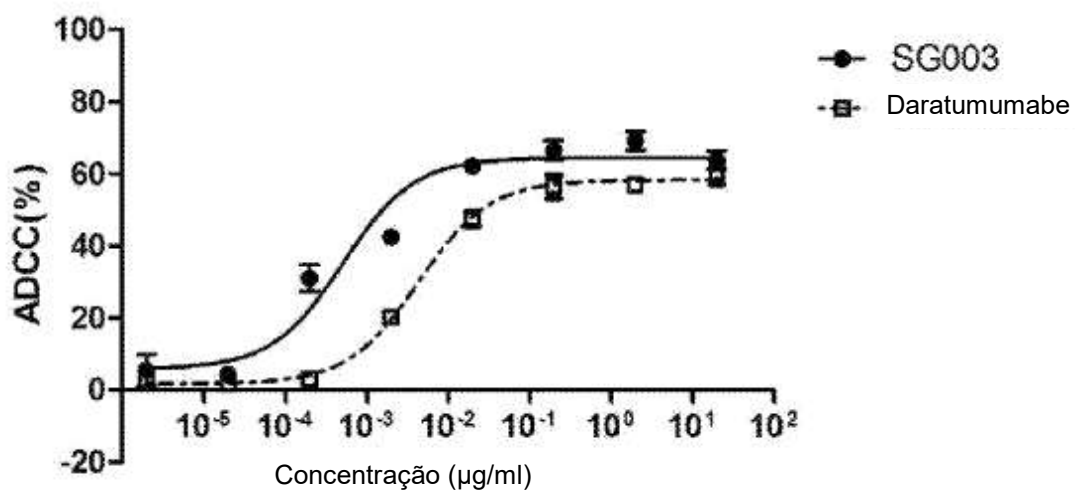


Fig. 5B

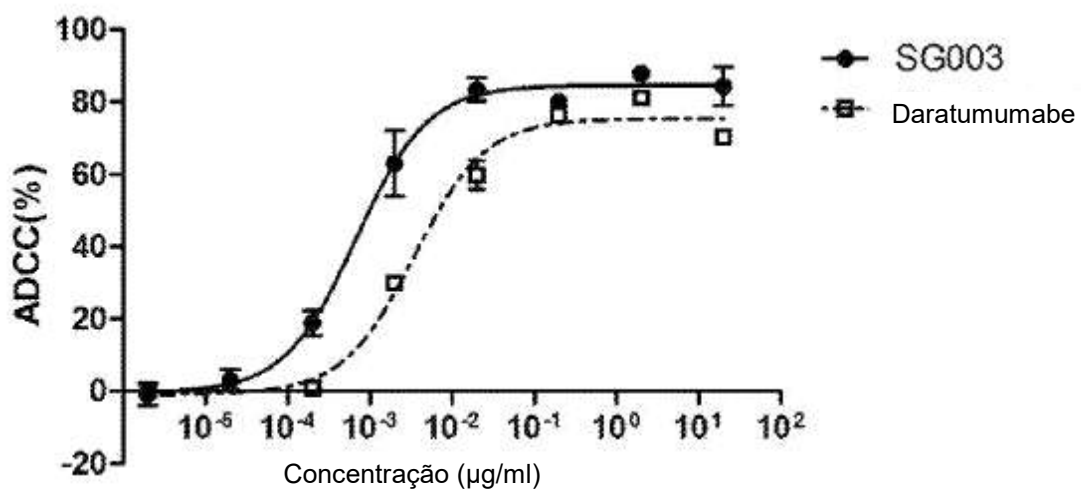


Fig. 5C

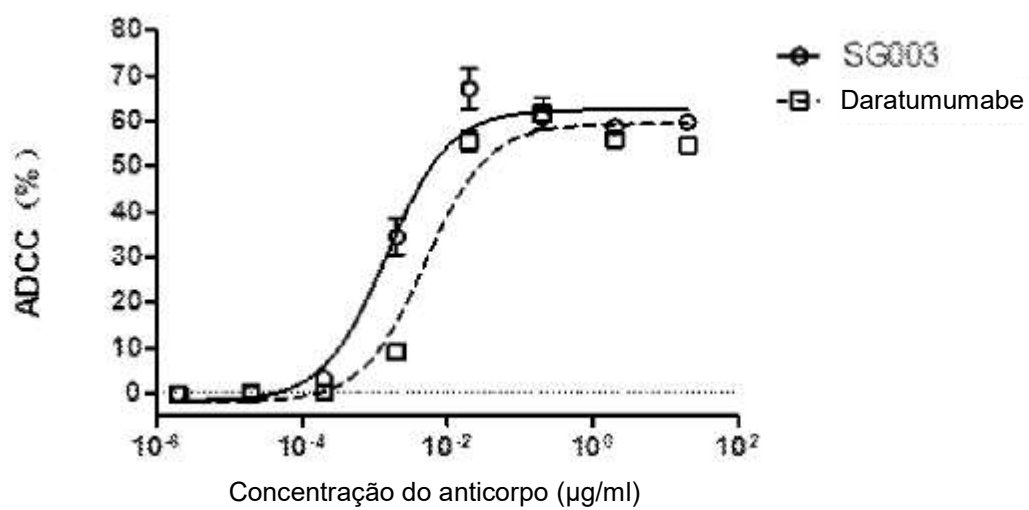


Fig. 5D

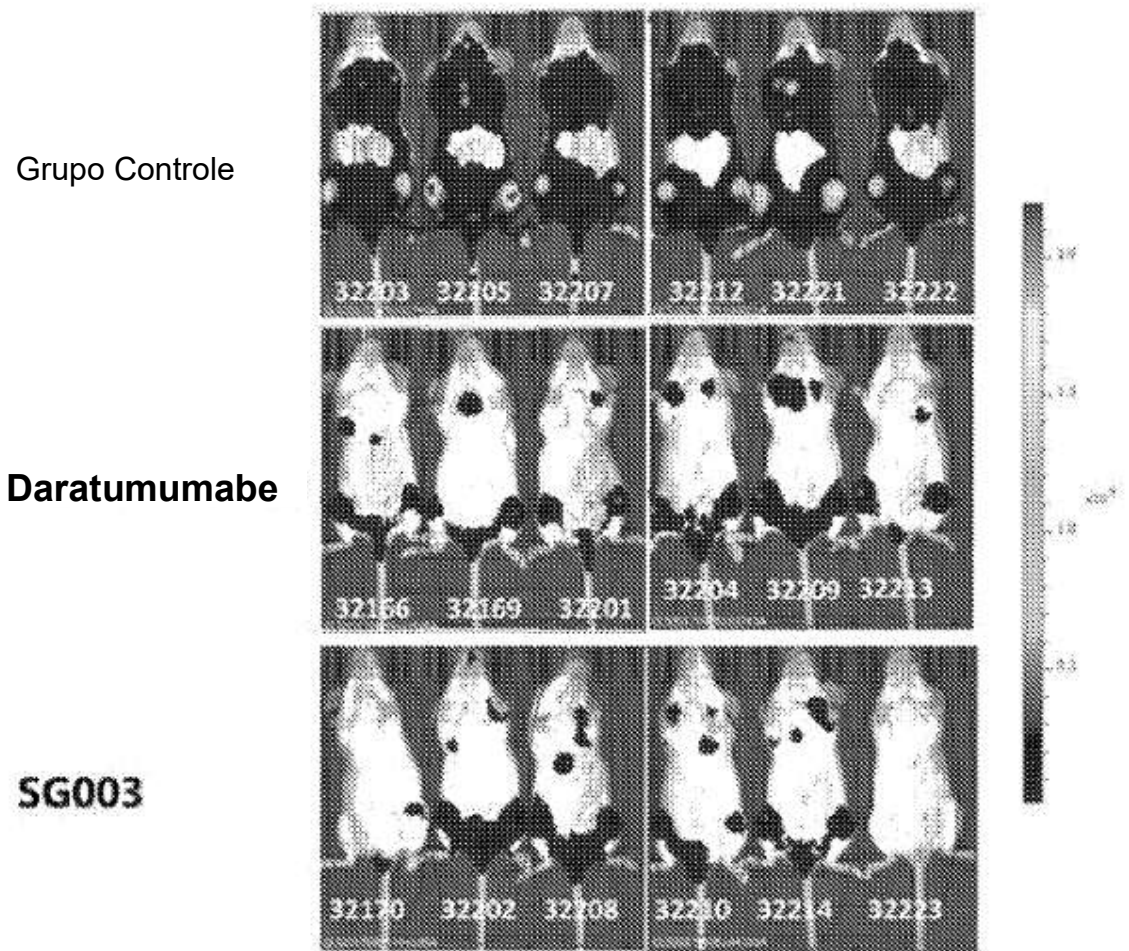


Fig. 6

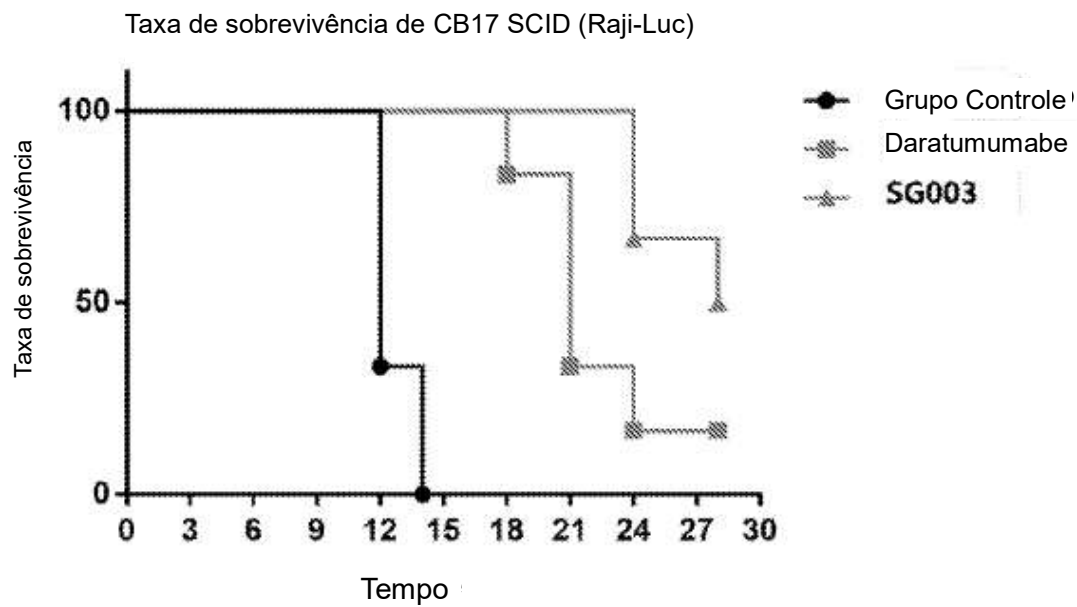
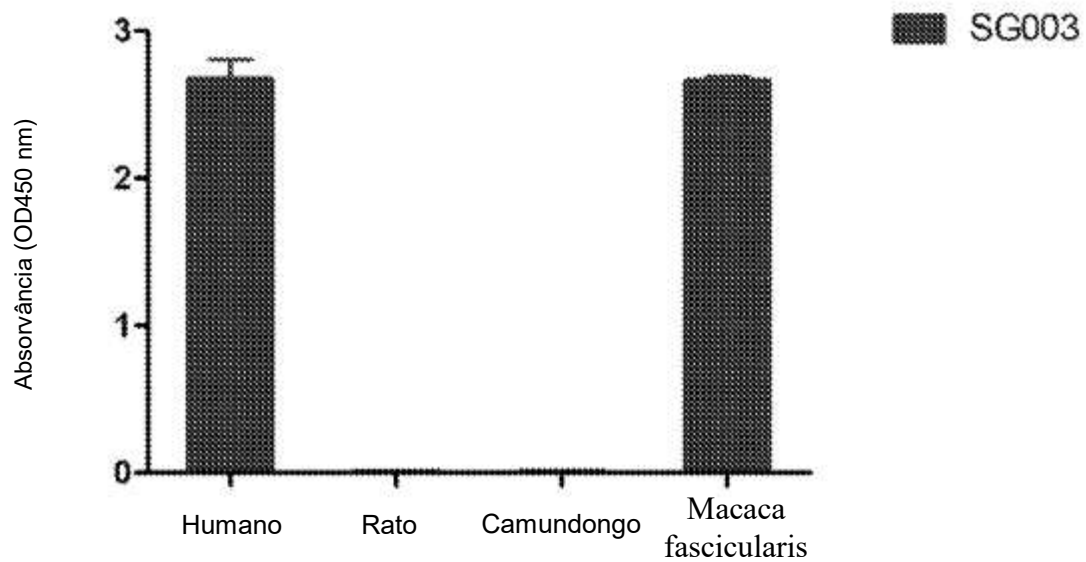
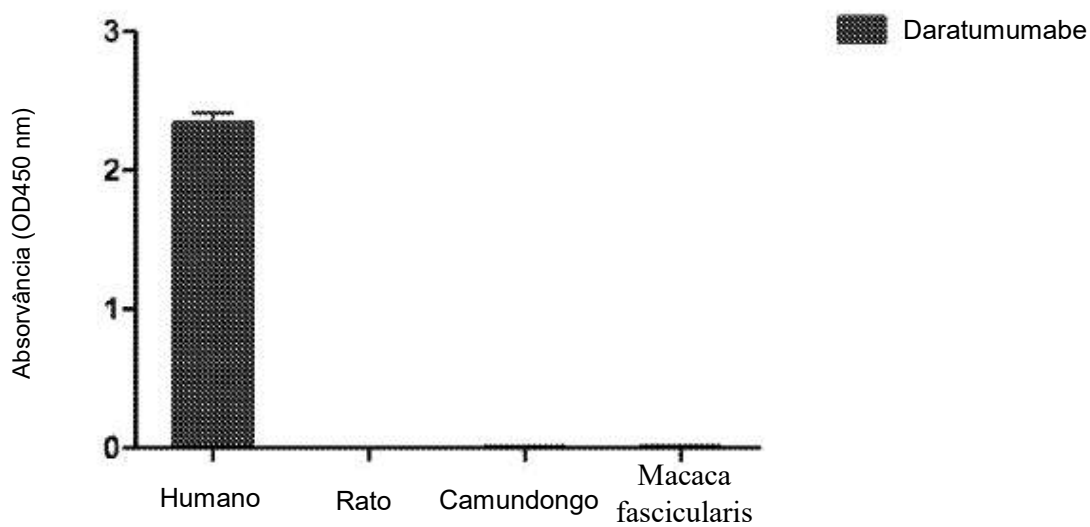


Fig. 7



Figs. 8A



Figs. 8B

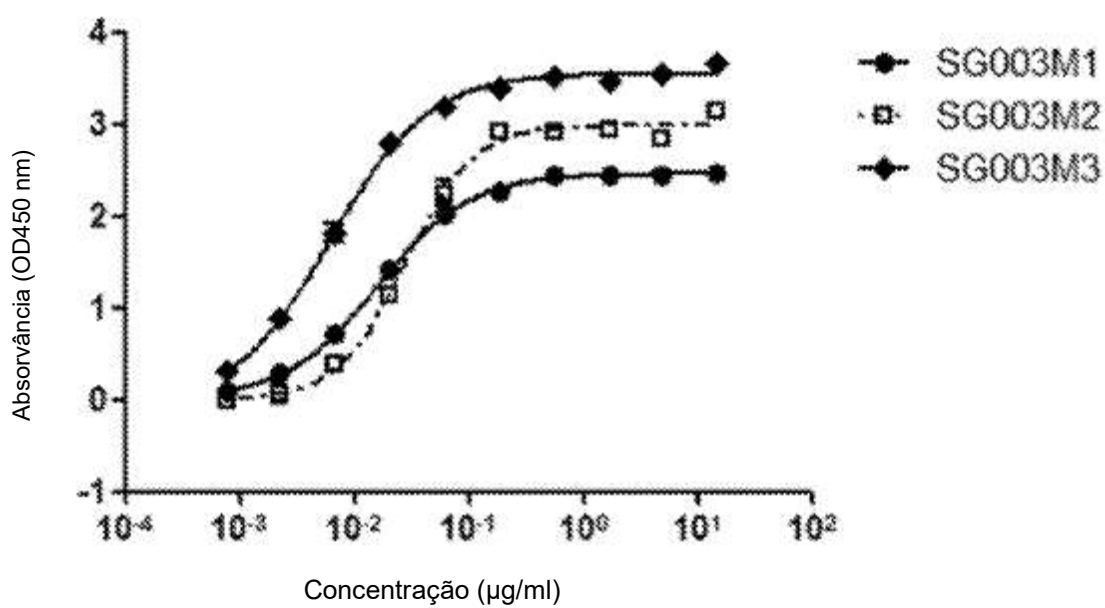


Fig. 9

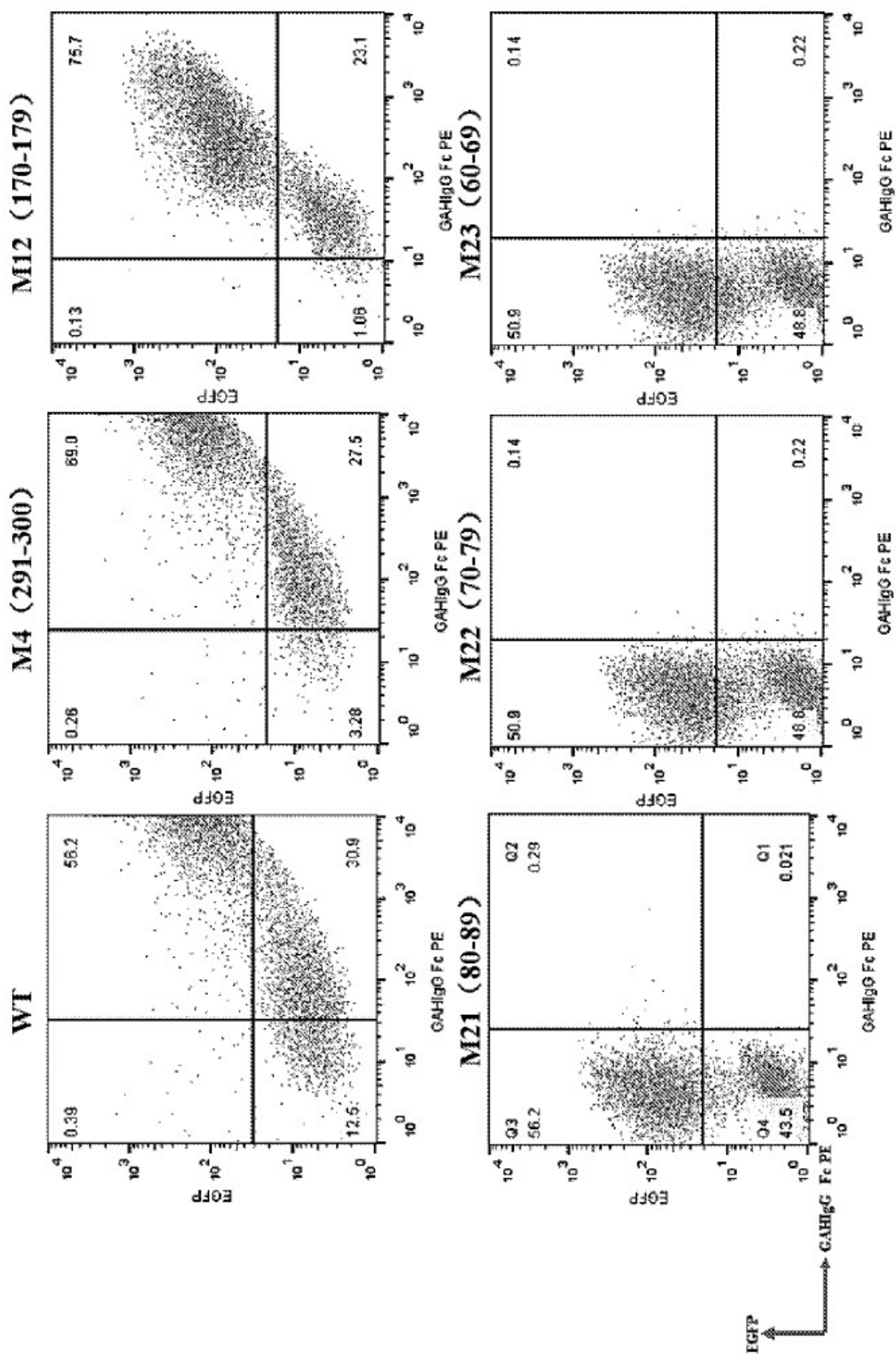


Fig. 10

RESUMO

“ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA A CD38, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA, MÉTODO PARA PREPARAR O DITO ANTICORPO OU FRAGMENTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO OU DO FRAGMENTO PARA PREVENIR OU TRATAR TUMORES E MÉTODO PARA INIBIR A LIGAÇÃO DE UMA PROTEÍNA CD38 A UM LIGANTE DE CD38”

Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a uma proteína CD38 em um valor de K_D abaixo de 1×10^{-9} M é fornecido pela invenção. O anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo apresenta reconhecimento específico forte e capacidades de ligação para a proteína CD38 e pode matar as células CD38⁺ por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou apoptose. Uma aplicação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo na prevenção e tratamento de tumores é adicionalmente fornecida pela presente invenção.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 204.484-6 - Listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 12/08/2020
- Hora de Geração do Código: 18:12:21
- Código de Controle:
 - Campo 1: D8E0B9F77B190180
 - Campo 2: 984B7D5A0974170D