

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 674 175**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2011 PCT/US2011/068244**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092616**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2011 E 11810777 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2658870**

(54) Título: **Anticuerpos anti-CD38 conjugados**

(30) Prioridad:

31.03.2011 US 201161470382 P
30.12.2010 US 201061428699 P
31.03.2011 US 201161470406 P
11.05.2011 US 201161485104 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2018

(73) Titular/es:

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (100.0%)
1-1 Doshomachi 4-chome Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP

(72) Inventor/es:

ELIAS, KATHLEEN, ANN;
LANDES, GREGORY;
SINGH, SHWETA;
KORVER, WOUTER;
DRAKE, ANDREW, WALLING;
HAAK-FRENDSCHO, MARY;
SNELL, GYORGY, PAL y BHASKAR, VINAY

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 674 175 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD38 conjugados

5 Antecedentes

CD38, también conocida como ADP ribosa hidrolasa cíclica, es una glucoproteína transmembrana de tipo II con un dominio extracelular C-terminal largo y un dominio citoplasmático N-terminal corto. CD38 es un miembro de un grupo de enzimas ligadas a la membrana o solubles relacionadas, que comprende CD157 y ADPR ciclase de *Aplysia*. Esta familia de enzimas tiene la capacidad única de convertir NAD en ADP ribosa cíclica o ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato.

Además, se ha informado que CD38 está implicado en la movilización de Ca^{2+} y en la transducción de señales a través de la fosforilación de tirosina de numerosas moléculas de señalización, que incluyen fosfolipasa C γ , ZAP-70, syk y c- cbl. Con base en estas observaciones, se propuso que CD38 es una molécula importante de señalización en la maduración y activación de las células linfoides durante su desarrollo normal.

Entre las células hematopoyéticas, se ha atribuido una variedad de efectos funcionales a la señalización mediada por CD38, que incluye proliferación de linfocitos, liberación de citoquinas, regulación de B y desarrollo y supervivencia de células mieloides, e inducción de la maduración de células dendríticas.

Sin embargo, el papel exacto de CD38 en la transducción de señales y la hematopoyesis sigue sin estar claro, ya que la mayoría de los estudios de transducción de señales han usado líneas celulares que sobreexpresan ectópicamente CD38 y anticuerpos monoclonales anti-CD38, que son ligandos no fisiológicos.

El presunto ligando natural de CD38 es CD31 (PECAM-1, Molécula 1 de Adherencia de Células Endoteliales de Plaquetas). CD31 es un miembro de 130 kD de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de plaquetas circulantes, neutrófilos, monocitos y linfocitos B sin alterar. Funcionalmente, se cree que CD31 actúa como una molécula de adhesión. Se ha sugerido que la interacción de CD38 con CD31 puede actuar para promover la supervivencia de las células leucémicas.

Los modelos animales deficientes para una sola molécula han sido en muchos casos herramientas fundamentales para comprender el papel biológico de la molécula en el animal. La suposición subyacente es que, si la proteína ejerce una función no redundante, entonces su falta completa dará como resultado la pérdida completa de esa función.

Se generaron ratones con inactivación de CD38. Estos animales muestran una pérdida casi completa de la actividad de NADasa asociada con el tejido. Sin embargo, estos animales son viables, lo que lleva a la conclusión de que CD38 y sus actividades no son necesarias para la vida. Sin embargo, estos ratones exhiben un defecto en su inmunidad innata y una respuesta humoral reducida dependiente de células T.

En contraste con los resultados en ratones, en humanos existe una fuerte evidencia circunstancial de que la ausencia de CD38 es incompatible con la vida. El análisis de más de 5.000 muestras de sangre de recién nacidos no identificó un solo CD38 $^-$ individual; sugiriendo que, a diferencia de los ratones, CD38 es necesario para la supervivencia. Por lo tanto, no está claro que las observaciones hechas en ratones con respecto a la función de CD38 puedan extrapolarse a humanos.

El CD38 está sobreexpresado en muchas neoplasias hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas neoplasias hematopoyéticas, incluido el linfoma no Hodgkin (NHL), el linfoma de Burkitt (BL), el mieloma múltiple (MM), la leucemia linfocítica crónica B (B- CLL), Leucemia linfocítica aguda de B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otro lado, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38- (Figura 1).

El documento WO 2006/125640 proporciona un método para usar regiones recombinantes de unión al antígeno y anticuerpos y fragmentos funcionales que contienen tales regiones de unión al antígeno que son específicas para CD38.

A pesar del progreso reciente en el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerosos, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 todavía tienen un mal pronóstico. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para tratar tales formas de cáncer.

Breve resumen de la presente invención

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y a CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2) que comprende:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9;
- b) una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 10; y
- 5 c) una fracción de fármaco unida covalentemente.

La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención y un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención.

10 La presente invención también proporciona un método para producir el anticuerpo de la presente invención que comprende cultivar una célula huésped de la presente invención en condiciones en las que se produce dicho anticuerpo.

15 La presente invención también proporciona un anticuerpo aislado de acuerdo con la presente invención para uso en un método para tratar el cáncer.

Breve resumen de la divulgación

20 Se proporcionan aquí reactivos y métodos para unión a CD38 y métodos para tratar enfermedades asociadas a CD38 y detectar CD38 usando agentes de unión específicos de CD38 que incluyen anticuerpos específicos para CD38. Para fines terapéuticos, los anticuerpos de la invención incluyen una fracción de fármaco conjugada, como se describe a continuación. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la invención pueden incluir opcionalmente un marcador detectable. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, se describe un anticuerpo aislado específico

25 para CD38 humano (SEQ ID NO: 1) y CD38 cynomolgus (SEQ ID NO: 2). Este anticuerpo está compuesto por una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que la región variable de cadena pesada está compuesta por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y en la que la región variable de cadena ligera también está compuesta por tres CDR, LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las secuencias de las CDR están representadas por: HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 4), HCDR3 (SEQ ID

30 NO: 5), LCDR1 (SEQ ID NO: 6), LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y LCDR3 (SEQ ID NO: 8). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.

En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto de una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto de una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 10. Esta combinación de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se denomina Ab79. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la secuencia de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado incluye un dominio Fc. En otras realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En aún otras realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc variante.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11. En otras realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12.

60 En algunas realizaciones, se proporciona una célula huésped, conteniendo la célula huésped el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12.

65 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir el anticuerpo de la divulgación. El método abarca cultivar una célula huésped que contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 en condiciones en las que él o los ácidos nucleicos aislados se expresan y se produce un anticuerpo. La fracción de fármaco se une luego al anticuerpo usando productos químicos estándar en la técnica.

- En algunas realizaciones, se describe un anticuerpo aislado específico para CD38 humano (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2). Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, en las que cada CDR de este anticuerpo puede diferir de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.
- En otras realizaciones, se describe un anticuerpo aislado específico para CD38 humano (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2). Este anticuerpo está compuesto por una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que la región variable de cadena pesada está compuesta por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y en la que la región variable de cadena ligera también está compuesta por tres CDR, LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las secuencias de las CDR están representadas por: HCDR1 (SEQ ID NO: 13), HCDR2 (SEQ ID NO: 14), HCDR3 (SEQ ID NO: 15), LCDR1 (SEQ ID NO: 16), LCDR2 (SEQ ID NO: 17) y LCDR3 (SEQ ID NO: 18). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.
- En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto de una región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 19. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 19. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 20. Esta combinación de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se denomina Ab19. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende alternativamente una etiqueta detectable para facilitar el diagnóstico.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la secuencia de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO: 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una fracción de fármaco conjugada.
- En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 21. En otras realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.
- En algunas realizaciones, se proporciona una célula huésped, conteniendo la célula huésped el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir el anticuerpo como se describe en este documento. El método abarca cultivar una célula huésped que contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 22 en condiciones en las que él o los ácidos nucleicos aislados se expresan y se produce un anticuerpo. La fracción del fármaco se une luego al anticuerpo usando productos químicos estándar en la técnica.
- En otras realizaciones, se describe un anticuerpo aislado específico para CD38 humano (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2). Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, en la que cada CDR de este anticuerpo puede diferir de las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.
- En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD38 aislado que se une específicamente a CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2), en el que el anticuerpo se une a CD38 humana con una KD de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o más y se une a CD38 de cynomolgus con una KD de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o más.
- En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que compiten con Ab79 y/o Ab19 por la unión a CD38 humano y/o CD38 de cynomolgus.
- Estas y otras realizaciones, características y ventajas potenciales serán evidentes con referencia a la siguiente descripción y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el perfil de expresión de CD38 en células de linaje linfoide. La expresión de CD38 se ha identificado en células pro-B ($CD34^+ CD19^+ CD20^-$), células B activadas ($CD19^+ CD20^+$), células plasmáticas ($CD138^+ CD19^- CD20^-$), células T $CD4^+$ y $CD8^+$ activadas, células NKT ($CD3^+ CD56^+$) y células NK ($CD56^+ CD16^+$). Además, la expresión de CD38 se encuentra en células progenitoras linfoideas ($CD34^+ CD45RA^+ CD10^+ CD19^-$) pero no en células madre linfoideas.

La Figura 2 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera de Ab79 y Ab19.

La Figura 3 representa las secuencias de CD38 humano y de cynomolgus.

La Figura 4 muestra la detección de la unión de Ab79 a tejidos normales mediante inmunofluorescencia. (A) colon humano normal teñido con Ab79 (B) colon humano normal teñido con anticuerpo de control irrelevante Palivizumab (C) microscopía óptica de colon humano normal contrastado con hematoxilina (D) próstata humana normal teñida con Ab79 (E) próstata humana normal teñida con anticuerpo de control irrelevante Palivizumab (F) microscopía óptica de próstata humana normal contrateñida con hematoxilina (G) ganglio linfático humano normal teñido con Ab79 (I) microscopía óptica de ganglio linfático humano normal contrateñido con hematoxilina.

La Figura 5 muestra la detección de la unión de Ab79 a muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple (MM). (A) Tinción de Ab79 inmunofluorescente de la médula ósea normal (B) Tinción de Ab79 inmunofluorescente representativa de la médula ósea de un paciente con MM. El epítopo reconocido por Ab79 se expresó fuertemente en aproximadamente el 50% o más de las células en todas las muestras de mieloma múltiple examinadas, mientras que en la médula ósea normal aproximadamente el 10% o menos de las células.

La Figura 6 representa la unión de Ab79 a diversas líneas celulares detectadas por inmunofluorescencia. (A) MOLP-8 (B) Daudi (C) RPMI (D) MCF7.

La Figura 7 muestra el análisis FACS de la expresión de Ab79 en células derivadas de la médula ósea de un paciente con mieloma múltiple (A) y PBMC de un paciente con leucemia linfocítica crónica (bloqueada en células $CD5^+$) (B).

La Figura 8 representa un estudio de respuesta a la dosis *in vivo* que compara Ab19, Ab79 y los anticuerpos de referencia BM1 y BM2.

La Figura 9 representa la visualización de la diseminación del linfoma en ratones tratados con Ab19, Ab79 y anticuerpos de referencia BM1 y BM2.

La Figura 10 representa la unión de Ab79 a CD38 basada en datos de cristalográfia de rayos X.

La Figura 11 representa una serie de diferentes realizaciones de ADC. Como se describe en este documento, los residuos enlazadores pueden cambiar, incluyendo la composición de los aminoácidos, los enlazadores autoinmolantes, etc.

La Figura 12 muestra los epítopes de CD38 humana que se unen a cada uno de los anticuerpos, los puntos de referencia 1 y 2, Ab19 y Ab79.

La Figura 13 representa la estructura de una combinación preferida de enlazador/fármaco. Como apreciarán los expertos en la técnica, el anticuerpo TSF79 (por ejemplo, Ab79) representado en la presente memoria puede cambiarse col anticuerpo AB19. De forma similar, como se analiza en el presente documento, se puede usar cualquier cantidad de combinaciones adicionales de fármaco/enlazador, además del derivado de auristatina E mostrado en este documento.

La Figura 14 representa el cambio porcentual en el número de células en monos cynomolgus a las 24 horas después de la dosificación.

La Figura 15 muestra la recuperación de agotamiento después de una dosis única de Ab79.

Descripción detallada del invento

Visión de conjunto

Se ha demostrado que el dominio extracelular de CD38 posee actividad enzimática bifuncional, que tiene tanto ADP-ribosil ciclasa como actividad de ADP-ribosil hidrolasa. Por lo tanto, CD38 puede catalizar la conversión de NAD⁺ en cADPR (ciclasa) y puede hidrolizarlo adicionalmente a ADP-ribosa (hidrolasa). cADPR está involucrado en la

movilización de calcio de las reservas intracelulares, que es una actividad de segundo mensajero importante para la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis.

Se ha documentado una mayor expresión de CD38 en una variedad de enfermedades de origen hematopoyético y se ha descrito como un marcador de pronóstico negativo en la leucemia linfoblástica crónica. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple (Jackson et al. (1988)), leucemia linfoblástica crónica (Moribito et al. (2001), Jelinek et al. (2001), Chevaliere et al. (2002), Dürig et al. (2002)), Leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfoblástica aguda (Keyhani et al. (2000)) que incluye leucemia linfocítica aguda de células B, macroglobulinemia de Waldenstrom, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia prolinfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda (Keyhani et al., (1993)), leucemia mieloide crónica (Marinov et al., (1993)), linfoma folicular, leucemia de células NK y leucemia de células plasmáticas. Como tal, CD38 proporciona un objetivo útil en el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético.

Varios anticuerpos anti-CD38 están en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres asociados a CD38 (en adelante denominados "Punto de referencia 1 and Punto de referencia 2"). Por consiguiente, los anticuerpos contra CD38 con efecto terapéutico y/o aplicaciones de diagnóstico son útiles. La descripción proporciona dos conjuntos de CDR anti-CD38 diferentes que se unen a diferentes epítopos de CD38, y que se unen tanto a formas humanas como de cynomolgus de CD38 y anticuerpos que contienen estas CDR. Los anticuerpos comprenden además conjugados de fármaco/enlazador como se describe en este documento.

Una ventaja, no observada en algunos de los anticuerpos anti-CD38 en pruebas clínicas, es la capacidad de unirse a CD38 de cynomolgus, ya que estos primates encuentran uso en pruebas preclínicas, y por lo tanto pueden conducir a una evaluación temprana de la dosificación, toxicidad, eficacia, etc.

25 Proteínas CD38

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD38 aislados que se unen específicamente a la proteína CD38 humana (y, como se describe a continuación, adicional y preferiblemente se unen específicamente a la proteína CD38 de primate). Como es sabido en la técnica, las proteínas CD38 se encuentran en varias especies. De particular uso en la presente invención son los anticuerpos que se unen tanto a las proteínas CD38 humanas como a las de primate, particularmente los primates utilizados en ensayos clínicos, tales como monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*, macaco comedor de cangrejo, a veces denominado en este documento "cyno"). Por "CD38 humana" o "antígeno CD38 humana" se hace referencia a la proteína de la SEQ ID NO: 1 o a una fracción funcional, tal como un epítopo, como se define aquí. En general, CD38 posee una cola intracitoplásica corta, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, en realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a la parte extracelular de la proteína CD38. Por "CD38 de cynomolgus" en la presente memoria se entiende la SEQ ID NO: 2 que es 92% idéntica a la CD38 humana.

Los sinónimos de CD38 incluyen ADP ribosil ciclase 1, cADPr hidrolasa 1, Cd38-rsl, ADP-ribosa hidrolasa 1 cíclica, 1-19, y antígeno NIM-R5.

Los anticuerpos anti-CD38 Ab79 de la invención interactúan con CD38 en varios residuos de aminoácidos, incluidos K121, F135, Q139, D141, M142, D202, V203, H205, Q236, E239, W241, S274, C275, K276, F284, C287, V288, K289, N290, P291, E292, D293. Como se describe aquí, otros anticuerpos que interactúan con estos residuos también encuentran uso en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención opcionalmente (y en algunos casos preferiblemente) no se unen a otros miembros de la familia de CD38 tales como CD157. Por ejemplo, las realizaciones preferidas en este documento no se unen a CD157 humana de la SEQ ID NO: 23 (GenBank, acceso NP_004325).

Anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD38, generalmente anticuerpos terapéuticos y/o de diagnóstico como se describe en el presente documento. Los anticuerpos que encuentran uso en la presente invención pueden tomar una serie de formatos como se describe en la presente memoria, que incluyen anticuerpos tradicionales, así como derivados de anticuerpos, fragmentos y miméticos, descritos a continuación. Esencialmente, la divulgación proporciona estructuras de anticuerpos que contienen un conjunto de 6 CDR como se define en la presente memoria (que incluye números pequeños de cambios de aminoácidos como se describe a continuación).

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, que incluyen,

pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. Por lo tanto, "isotipo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigenicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE. Debe entenderse que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases.

La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (denominada en lo sucesivo "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es la más significativa. "Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida uniformemente. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad", "CDR") y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable generalmente abarca residuos de aminoácidos desde aproximadamente los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; "L" significa cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y alrededor de aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" significa cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, los residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Las CDR específicas de la invención se describen a continuación.

A lo largo de la presente memoria, el sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, residuos 1-107 de la región variable de cadena ligera y residuos 1-113 de la región variable de cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., citado anteriormente (1991)), con el sistema de numeración de la UE utilizado para la región Fc.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno, o más específicamente, de unión al epítopo de anticuerpos. "Epítopo" se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Los epítopos son grupos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por ejemplo, como se muestra aquí, los dos anticuerpos diferentes a los que se hace referencia en este documento como "Ab19" y Ab79 "se unen a diferentes epítopos en la molécula de CD38".

El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominada componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están bloqueados eficazmente por el péptido de unión específicamente al antígeno; en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión específicamente al antígeno.

Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se pueden distinguir porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, por ejemplo mediante "agrupamiento", como se describe en los ejemplos de los estudios de cristalográfia por rayos X como se muestra en los Ejemplos, ha identificado los residuos de aminoácidos que se unen a los anticuerpos tanto de la descripción (que incluyen Ab19 y Ab79) como de la técnica anterior (Punto de referencia 1 y Punto de referencia 2), como se muestra en la Figura 12.

En la presente invención, Ab79 como se describe en los Ejemplos, interactúa con varios residuos de aminoácidos de CD38 que incluyen K121, F135, Q139, D141, M142, E239, W241, S274, C275, K276, F284, V288, K289, N290,

P291, E292 y D293. Cabe señalar que estos residuos son idénticos tanto en humanos como en monos cyno, con la excepción de que S274 es realmente F274 en cyno. Estos residuos pueden representar el epítopo inmunodominante y/o residuos dentro de la huella del péptido de unión específicamente al antígeno.

- 5 Como se describe en la presente memoria, Ab19 se une a un epítopo diferente, que incluye G91, E103, E1034, D105, Q107, M110, K111, T114, Q115, T148, V192, R194, R195, F196, A199, H228, N229, Q231, E233 y K234. Cabe señalar que estos residuos son idénticos tanto en humanos como en monos cyno, con la excepción de que M110 es V110 en cyno y A199 es T199 en cyno.
- 10 Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos que compiten con AB79 y Ab19 uniéndose a cualquiera de estos epítopenos pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes. Cabe señalar que Ab79 y BM1 tienen cierta superposición; por lo tanto, los anticuerpos que compiten con Ab79 y que no son BM1 encuentran uso en la presente invención.
- 15 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen tanto a CD38 humana como de cyno e interactúan con al menos el 80%, 90%, 95% o 98% de estos residuos. Dicho de otra manera, el área superficial de la zona de interacción no es más que el área de estos residuos.
- 20 La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Con base en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a edición, publicación de los NIH, No. 91-3242, EA Kabat et al.).
- 25 En la subclase IgG de inmunoglobulinas, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en este documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en la presente invención son los dominios de cadena pesada, que incluyen los dominios de cadena pesada (CH) constantes y los dominios de bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isótipos IgG tienen cada uno tres regiones CH. En consecuencia, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-<220> de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.
- 30 Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región de bisagra. Por "bisagra" o "región de bisagra" o "región de bisagra de anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en este documento se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre los dominios constantes primero y segundo de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición <220> de la UE, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición 237 del residuo de la UE. Así, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define aquí para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, con la "bisagra inferior" que se refiere generalmente a las posiciones 226 o 230.
- 35 De particular interés en la presente invención son las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" como se usa en la presente memoria se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra N-terminal flexible para estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3 (Cy2 y Cy3) y la región de bisagra inferior entre Cy1 (Cy1) y Cy2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para incluir los residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe más completamente a continuación, las modificaciones de aminoácidos se realizan en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores FcYR o al receptor FcRn.
- 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95
- 45 En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" en el presente documento se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes, incluyendo una o más modificaciones como se describe en este documento.
- 50 Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en este documento como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominados "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de cada uno, respectivamente.
- 55 En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd

que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, *Nature* 341: 544-546 que consiste en un dominio variable único, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-426, Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883), (viii) Fv de cadena única biespecífica (WO 03/11161) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (Tomlinson et al., 2000, *Methods Enzymol.*, 326: 461- 479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444- 6448).

10 Anticuerpos químéricos y humanizados

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo químérico y/o un anticuerpo humanizado. Es decir, en la presente invención, los conjuntos de CDR se pueden usar con regiones constantes distintas a las específicamente descritas por la secuencia en el presente documento.

En general, tanto "anticuerpos químéricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos químéricos" comprenden tradicionalmente la región o regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano. Los "anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos que han tenido las regiones marco de dominio variable intercambiadas por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo, excepto dentro de sus CDR. Las CDR, algunas o todas de ellas son codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de la lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por los CDR injertados. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones, 1986, *Nature* 321: 522-525, Verhoeven et al., 1988, *Science* 239: 1534-1536. La "retromutación" de los residuos del marco acceptor seleccionado con los residuos donantes correspondientes a menudo se requiere para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (documentos US 5530101, US 5585089, US 5693761, US 5693762, US 6180370, US 5859205, US 5821337, US 6054297 y US 6407213). El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y de este modo típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar usando ratones con un sistema inmune genéticamente modificado. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies*, *Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA), y las referencias citadas en este documento). Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al., 1988; *Nature* 332: 323- 329; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239: 1534- 1536; Queen et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci, USA* 86: 10029- 33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285- 9, Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57 (20): 4593- 9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4181- 4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng* 11: 321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de reestructuración de superficie, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 969-973. En una realización, el anticuerpo original ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Los métodos basados en la estructura se pueden emplear para la humanización y la maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en el documento USSN 11/004.590. Los métodos basados en la selección se pueden emplear para humanizar y/o afinar las regiones variables de anticuerpos maduros, que incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en Wu et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 294: 151-162; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272 (16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271 (37): 22611-221818; Rader et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, *Protein Engineering* 16 (10): 753-759. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de solo partes de las CDR, incluidos, entre otros, los métodos descritos en el documento USSN 09/810.510; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, *J. Immunol.* 169: 3076-3084.

55 En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos multiespecíficos, y notablemente anticuerpos biespecíficos, también denominados a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes, o diferentes epítopos en el mismo antígeno. Los diacuerpos se pueden fabricar de una variedad de formas conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, *Current Opinion Biotechnol.*, 4: 446-449), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos.

60 En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizados que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. Hu et al., 1996, *Cancer Res.* 56: 3055-3061. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc, y puede incluir algo o toda la región de bisagra.

65 Los anticuerpos de la presente invención generalmente están aislados o son recombinantes. "Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente memoria, significa un polipéptido que se ha

identificado y separado y/o recuperado de una célula o un cultivo de células a partir del cual se expresó. Ordinariamente, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigenicas. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD38 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD38.

5 Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo, isoforma o variante de CD38 humana o CD38 de cynomolgus puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies, tales como homólogos de especies de CD38. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

10 Los anticuerpos monoclonales aislados, que tienen especificidades diferentes, se pueden combinar en una composición bien definida. Por lo tanto, por ejemplo, el Ab79 y Ab19 se pueden combinar en una sola formulación, si se desea.

15 15 Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se unen específicamente a los ligandos CD38 (por ejemplo, las proteínas CD38 humanas y de cynomolgus de las SEQ ID NOs: 1 y 2. "Unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específica para" un antígeno o un epítopo particular significa unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que es similar al objetivo.

20 25 La unión específica para un antígeno particular o un epítopo puede ser exhibida, por ejemplo, mediante un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítopo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control con respecto al antígeno o epítopo.

30 35 Además, la unión específica para un antígeno particular o un epítopo puede ser exhibida, por ejemplo, mediante un anticuerpo que tiene un KA o Ka para un antígeno o epítopo de al menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para el epítopo en relación con un control, donde KA o Ka se refiere a una velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

Modificaciones de anticuerpos

40 40 La presente invención proporciona además anticuerpos variantes. Es decir, hay una serie de modificaciones que se pueden realizar a los anticuerpos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de aminoácidos en la región Fc, variantes de glicosilación, modificaciones covalentes de otros tipos, etc.

45 45 Por "variante" en este documento se entiende una secuencia polipeptídica que difiere de la de un polipéptido original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Las modificaciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones, inserciones y eliminaciones, prefiriéndose la primera en muchos casos.

50 50 En general, las variantes pueden incluir cualquier cantidad de modificaciones, siempre que la función de la proteína todavía esté presente, como se describe en este documento. Es decir, en el caso de variantes de aminoácidos generadas con las CDR de Ab79 o Ab19, por ejemplo, el anticuerpo todavía debe unirse específicamente tanto a CD38 humana como de cynomolgus. De forma similar, si se generan variantes de aminoácidos con la región Fc, por ejemplo, los anticuerpos variantes deben mantener las funciones de unión al receptor requerido para la aplicación o indicación particular del anticuerpo.

55 55 Sin embargo, en general, generalmente se utilizan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos ya que con frecuencia el objetivo es alterar la función con un número mínimo de modificaciones. En algunos casos, hay de 1 a 5 modificaciones, con 1-2, 1-3 y 1-4 que también encuentran uso en muchas realizaciones.

60 60 Debe observarse que el número de modificaciones de aminoácidos puede estar dentro de dominios funcionales: por ejemplo, puede ser deseable tener de 1 a 5 modificaciones en la región Fc de proteínas de tipo silvestre o modificadas genéticamente, así como de 1 a 5 modificaciones en la región Fv, por ejemplo. Una secuencia polipeptídica variante poseerá preferiblemente al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o hasta 98 o 99% de identidad con las secuencias originales (por ejemplo, las regiones variables, las regiones constantes, y/o las secuencias de cadena pesada y ligera para Ab79 y/o Ab19). Cabe señalar que, dependiendo del tamaño de la secuencia, el porcentaje de identidad dependerá de la cantidad de aminoácidos.

- Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en el presente documento se entiende la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S100A se refiere a un polipéptido variante en el que la serina en la posición 100 se reemplaza por alanina. Por "inserción de aminoácido" o "inserción" como se usa en el presente documento se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original. Por "eliminación de aminoácido" o "eliminación" como se usa en el presente documento se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original.
- 5 Por "polipéptido original", "proteína original", "polipéptido precursor", o "proteína precursora" como se usa en la presente memoria, se entiende un polipéptido no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. En general, los polipéptidos originales en este documento son Ab79 y Ab19. El polipéptido original puede referirse al propio polipéptido, composiciones que comprenden el polipéptido original o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. De acuerdo con esto, por "polipéptido Fc original" como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido Fc que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo original" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante.
- 10 Por "tipo silvestre" o "WT" o "nativo" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, que incluye variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. de WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.
- 15 Por "región Fc variante" en este documento se entiende una secuencia Fc que difiere de la de una secuencia Fc de tipo silvestre en virtud de al menos una modificación de aminoácido. La variante Fc puede referirse al polipéptido Fc en sí, a composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc, o a la secuencia de aminoácidos.
- 20 Por "maduración por afinidad" se entiende la modificación de aminoácidos en las CDR de un anticuerpo para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno. Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esas alteraciones. En algunos casos, aunque es raro, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno, pero generalmente no se prefiere esto.
- 25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria como referencia solamente, se realizan una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR del anticuerpo (ya sea Ab79 o Ab19). En general, solo 1 o 2 o 3 aminoácidos se sustituyen en una única CDR, y generalmente no más de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios se realizan dentro de un conjunto de CDR. Sin embargo, debe apreciarse que cualquier combinación de no sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede combinarse independientemente y opcionalmente con cualquier otra sustitución.
- 30 En algunos casos, las modificaciones de aminoácidos en las CDR se denominan "maduración por afinidad". Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esas alteraciones. En algunos casos, aunque es raro, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno, pero generalmente no se prefiere esto.
- 35 La maduración de afinidad puede realizarse para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno en al menos aproximadamente 10% hasta 50-100-150% o más, o de 1 a 5 veces en comparación con el anticuerpo "original". Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Marks et al., 1992, Biotechnology 10: 779-783, que describe la maduración por afinidad mediante transposición del dominio de cadena pesada variable (VH) y del dominio de cadena ligera variable (VL). La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o marco se describe en: Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 91: 3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169: 147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154 (7): 3310-9; y Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896, por ejemplo.
- 40 Alternativamente, se pueden realizar modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de anticuerpos que son "silenciosas", por ejemplo, que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Estos pueden realizarse por varias razones, incluida la optimización de la expresión (como se puede hacer para los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos).
- 45 Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición de las CDR y los anticuerpos de la divulgación CDR y anticuerpos variantes; es decir, los anticuerpos de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de Ab79 y Ab19. Además, como se expone a continuación, las modificaciones de aminoácidos también pueden realizarse de forma independiente y opcionalmente en cualquier región fuera de las CDR, incluidas regiones marco y constantes.
- 50 En algunas realizaciones, se describen anticuerpos variantes de Ab79 y Ab19 que son específicos para CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2). Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, en donde cada CDR de este anticuerpo puede diferir de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. En otras realizaciones, la variante de anticuerpo anti-CD38 está compuesta de seis CDR, en donde cada CDR de este anticuerpo puede diferir de las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.
- 55
- 60
- 65

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD38 de la invención están compuestos de un dominio Fc variante. Como se conoce en la técnica, la región Fc de un anticuerpo interactúa con varios receptores y ligandos Fc, impartiendo una serie de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Estos receptores Fc incluyen, pero no se limitan a, (en humanos) FcγRI (CD64) incluyendo las isoformas FcγRⅠa, FcγRⅠb y FcγRⅠc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRⅡa (que incluyen los alotipos H131 y R131), FcγRⅡb (que incluye FcγRⅡb-1 y FcγRⅡb-2) y FcγRⅢc; y FcγRⅢ (CD16), incluidas las isoformas FcγRⅢa (incluidos los alotipos V158 y F158, correlacionados con la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) y FcγRⅢb (incluidos los alotipos FcγRⅢb-NA1 y FcγRⅢb-NA2), FcRn (el receptor neonatal), C1q (proteína del complemento implicada en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) y FcRn (el receptor neonatal implicado en la vida media en suero). Se pueden realizar modificaciones adecuadas en una o más posiciones como se describe en general, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos 11/841.654 y las referencias citadas en la misma, los documentos US 2004/013210; US 2005/0054832; US 2006/0024298; US 2006/0121032; US 2006/0235208; US 2007/0148170; USSN 12/341,769; la patente de los Estados Unidos No. 6.737.056; la patente de los Estados Unidos No. 7.670.600; y la patente de Estados Unidos No. 6.086.875, y en particular para sustituciones de aminoácidos específicas que aumentan la unión a los receptores de Fc.

Además de las modificaciones descritas anteriormente, se pueden hacer otras modificaciones. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, *Nature Biotech.* 14: 1239-1245). Además, hay una variedad de modificaciones covalentes de anticuerpos que se pueden realizar como se describe a continuación.

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos se incluyen dentro del alcance de esta invención, y generalmente, pero no siempre, se realizan después de la traducción. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C-terminales.

Los residuos de cisteínilo se hacen reaccionar más comúnmente con α-haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para obtener derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteínilo también pueden formar derivados por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α-bromo-β-(5-imidozoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

Además, las modificaciones en las cisteínas son particularmente útiles en las aplicaciones de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que se describen adicionalmente a continuación. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos puede diseñarse para contener una o más cisteínas que son particularmente "reactivas con tiol", para permitir una colocación más específica y controlada de la fracción del fármaco. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.521.541, incorporada como referencia en su totalidad en este documento.

Los residuos de histidilo forman derivados por reacción con dietilpirocetonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La formación de derivados con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para formar derivados de residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pantanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glicoxilato.

Los residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La formación de derivados de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo arginina ε-amino.

La modificación específica de residuos de tirosilo se puede realizar, con especial interés en la introducción de marcas espectrales en residuos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetyl tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodian usando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de clorammina T descrito anteriormente.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas (R'-N=C=N-R'), en las que R y R' son opcionalmente grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexilo- 3-2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

La formación de derivados con agentes bifuncionales es útil para entrecruzar anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una variedad de métodos, además de los métodos descritos a continuación. Los agentes de entrecruzamiento comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes para formación de derivados tales como metil-3-[*p*-azidofenil]ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar enlaces cruzados en presencia de luz. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua tales como los carbohidratos activados con bromuro de cromo y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, se emplean para la inmovilización de proteínas.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desaminan frecuentemente en los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desaminan en condiciones ligeramente ácidas. Cualquiera de las formas de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (TE Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, WH Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Además, como apreciarán los expertos en la materia, se pueden añadir marcadores (incluidos fluorescentes, enzimáticos, magnéticos, radioactivos, etc., a los anticuerpos (así como a las otras composiciones de la invención).

25 Glicosilación

Otro tipo de modificación covalente es la alteración en la glicosilación. En otra realización, los anticuerpos descritos en este documento pueden modificarse para incluir una o más glicoformas modificadas genéticamente. Por "glicoforma modificada genéticamente" como se usa en la presente memoria se entiende una composición de carbohidrato que está unida covalentemente al anticuerpo, en la que dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de un anticuerpo original. Las glicoformas modificadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen, pero no se limitan a potenciar o reducir la función efectora. Una forma preferida de glicoforma modificada por ingeniería genética es la afucosilación, que se ha demostrado que se correlaciona con un aumento en la función de ADCC, presumiblemente a través de una unión más estrecha al receptor Fc_YRIIIa. En este contexto, "afucosilación" significa que la mayor parte del anticuerpo producido en las células huésped está sustancialmente desprovisto de fucosa, por ejemplo, 90-95-98% de los anticuerpos generados no tienen fucosa apreciable como un componente de la fracción carbohidrato del anticuerpo (generalmente unido a N297 en la región Fc). Definidos funcionalmente, los anticuerpos afucosilados generalmente exhiben al menos una afinidad del 50% o superior para el receptor Fc_YRIIIa.

40 Se pueden generar glicoformas modificadas mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473, los documentos US 6.602.684, USSN 10/277.370, USSN 10/113.929, PCT WO 00/61739A1, PCT WO 01/29246A1, PCT WO 02/31140A1, PCT WO 02/30954A1; (tecnología Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; y tecnología de modificación de glicosilación GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Zúrich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectantes que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, expresando una IgG en diversos organismos o líneas celulares, modificadas o no (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células de hibridoma de rata YB2/0, mediante enzimas reguladoras implicadas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando el carbohidrato o los carbohidratos después de que se haya expresado la IgG. Por ejemplo, el "anticuerpo modificado con azúcar" o "tecnología SEA" de Seattle Genetics funciona mediante la adición de sacáridos modificados que inhiben la fucosilación durante la producción; véase, por ejemplo, el documento 20090317869. La glicoforma modificada típicamente se refiere a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; por lo tanto, un anticuerpo puede incluir una glicoforma modificada genéticamente.

Alternativamente, la glicoforma modificada genéticamente puede referirse a la variante de IgG que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos. Como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, discutidos a continuación), o la célula u organismo huésped en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se discuten a continuación.

60 La glicosilación de polipéptidos típicamente está enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias del triplete asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto,

la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

5 La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación unidos a O). Por 10 facilidad, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido objetivo en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

15 Otro medio para aumentar el número de residuos de carbohidratos en el anticuerpo es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de 20 fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306.

25 La eliminación de los residuos de carbohidrato presentes en el anticuerpo de partida (por ejemplo, después de la traducción) puede lograrse química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja intacto el polipéptido. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de residuos de carbohidratos en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas como lo describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350, completamente incorporado por referencia, la glicosilación en sitios de glicosilación potenciales se puede prevenir mediante el uso del compuesto tunicamicina como lo describen Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105. La tunicamicina bloquea la formación 30 de enlaces proteína-N-glucósido.

35 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a diversos polímeros no proteináceos, que incluyen, pero no se limitan a, varios polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida, por ejemplo, en el Catálogo de PEG 2005-2006 de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio web de Nektar), las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Además, como se conoce en la técnica, las sustituciones de aminoácidos se 40 pueden realizar en diversas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0114037A1.

CDR específica y realizaciones de región variable

45 La presente invención proporciona una cantidad de anticuerpos, cada uno con un conjunto específico de CDR. Como se describió anteriormente, los anticuerpos pueden definirse por conjuntos de 6 CDR, por regiones variables, o por cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, incluidas las regiones constantes. Como se describió anteriormente, también se pueden realizar sustituciones de aminoácidos. Para referencia solamente, en general, en el contexto de cambios dentro de las CDR, debido a la longitud relativamente corta de las CDR, las modificaciones 50 de aminoácidos se describen generalmente en términos del número de modificaciones de aminoácidos que pueden realizarse. Si bien esto también es aplicable a la discusión del número de modificaciones de aminoácidos que se pueden introducir en secuencias variables, constantes o de longitud completa, además del número de cambios, también es apropiado definir estos cambios en términos del "% de identidad". Por lo tanto, como se describe en la 55 presente memoria, los anticuerpos incluidos en la descripción son 80, 85, 90, 95, 98 o 99% idénticos a las SEQ ID NOs enumeradas aquí.

En el contexto del anticuerpo Ab79, el conjunto de CDR es el siguiente: las tres CDR de la cadena pesada incluyen HCDR1 SEQ ID NO: 3 (HCDR1), SEQ ID NO: 4 (HCDR2) y SEQ ID NO: 5 (HCDR3), y las tres CDR de la cadena ligera incluyen SEQ ID NO: 6 (LCDR1), SEQ ID NO: 7 (LCDR2) y SEQ ID NO: 8 (LCDR3).

60 En el contexto de Ab19, el conjunto de CDR es el siguiente: HCDR1 (SEQ ID NO: 13), HCDR2 (SEQ ID NO: 14) y HCDR3 (SEQ ID NO: 15) y LCDR1 (SEQ ID NO: 16), LCDR2 (SEQ ID NO: 17) y LCDR3 (SEQ ID NO: 18).

65 Se excluyen específicamente de la presente invención los anticuerpos de las SEQ ID NOs.: 24 y 25 (las cadenas pesadas y ligeras del Punto de referencia 1) y las SEQ ID NOs.: 26 y 27 (las cadenas pesadas y ligeras del Punto de

referencia 2). Cabe señalar que estos anticuerpos no reaccionan en forma cruzada con CD38 de cynomolgus, que se discuten a continuación.

Los anticuerpos de la invención reaccionan en forma cruzada con CD38 humana y de cynomolgus y, por lo tanto, son anticuerpos que reaccionan en forma cruzada entre especies. Un "anticuerpo que reacciona en forma cruzada entre especies" es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un antígeno de una primera especie de mamífero que es casi igual a la afinidad de unión por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. La reactividad cruzada entre especies se puede expresar, por ejemplo, como una relación de la KD de un anticuerpo por un antígeno de la primera especie de mamífero sobre la KD del mismo anticuerpo por el homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero en la que la relación es 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 2, 5; 10; 15 hasta 20. Alternativa o adicionalmente, un anticuerpo "reacciona en forma cruzada entre especies" cuando muestra eficacia terapéutica o diagnóstica cuando se administra a la segunda especie. Por lo tanto, en el presente caso, los anticuerpos de la invención reaccionan en forma cruzada con CD38 de cynomolgus, muestran eficacia preclínica cuando se administran a primates cynomolgus y, por lo tanto, se consideran reactivos cruzados.

En algunas realizaciones descritas aquí solo como referencia, se proporcionan anticuerpos que compiten con los anticuerpos de la invención (por ejemplo, con Ab79 y/o Ab19) para unirse a CD38 humana y/o CD38 de cynomolgus, pero no se incluyen BM1 ni BM2. La competencia para unirse a CD38 o una porción de CD38 por dos o más anticuerpos anti-CD38 puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada, como se conoce en la técnica.

La competencia en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier reducción detectablemente significativa en la propensión de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, Ab79 o Ab19) para unirse a su compañero de unión particular, por ejemplo, CD38, en presencia del compuesto de prueba. Típicamente, la competencia significa una reducción de al menos aproximadamente 10-100% en la unión de un anticuerpo de la invención a CD38 en presencia del competidor, según se mide mediante técnicas estándar tales como ensayos ELISA o Biacore®. Por lo tanto, por ejemplo, es posible establecer criterios de competitividad en los que se detecta al menos aproximadamente 10% de inhibición relativa; se detecta al menos aproximadamente 15% de inhibición relativa; o se detecta al menos aproximadamente un 20% de inhibición relativa antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo. En casos en los que los epítopos que pertenecen a anticuerpos competitivos están localizados cerca en un antígeno, la competición puede estar marcada por una inhibición relativa mayor del 40% de la unión a CD38 (por ejemplo, al menos aproximadamente 45% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 50% de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 55% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 60% de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 65% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 70% de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 75% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 80 % de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 85% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 90% de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 95% de inhibición, o nivel más alto de inhibición relativa).

En algunos casos, uno o más de los componentes de los ensayos de unión competitiva están marcados, como se analiza a continuación en el contexto de las aplicaciones de diagnóstico.

También puede darse el caso de que pueda existir competencia entre anticuerpos anti-CD38 con respecto a más de un epítopo de CD38, y/o una porción de CD38, por ejemplo, en un contexto donde las propiedades de unión al anticuerpo de una región particular de CD38 se retienen en fragmentos de las mismas, como en el caso de un epítopo lineal bien presentado localizado en diversos fragmentos probados o un epítopo conformacional que se presenta en fragmentos de CD38 suficientemente grandes así como en CD38.

La evaluación de la competencia implica típicamente una evaluación de la unión inhibidora relativa usando un anticuerpo de la invención, CD38 (tanto humano como de cynomolgus o ambos) y la molécula de prueba. Las moléculas de prueba pueden incluir cualquier molécula, incluidos otros anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, etc. Los compuestos se mezclan en cantidades que son suficientes para hacer una comparación que imparte información sobre la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a las otras moléculas presentes.

Las cantidades de compuesto de prueba, CD38 y anticuerpos de la invención pueden variarse. Por ejemplo, para las evaluaciones mediante ELISA se requieren aproximadamente 5-50 µg (por ejemplo, aproximadamente 10-50 µg, aproximadamente 20-50 µg, aproximadamente 5-20 µg, aproximadamente 10-20 µg, etc.) del anticuerpo anti-CD38 y/o objetivos de CD38 para evaluar si existe competencia. Las condiciones también deberían ser adecuadas para la unión. Típicamente, las condiciones fisiológicas o casi fisiológicas (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 20-40°C, pH de aproximadamente 7-8, etc.) son adecuadas para la unión anti-CD38:CD38.

A menudo, la competencia está marcada por una inhibición relativa significativamente mayor que aproximadamente el 5% según se determina por ELISA y/o análisis FACS. Puede ser deseable establecer un umbral más alto de inhibición relativa como criterio/determinante de lo que es un nivel adecuado de competencia en un contexto particular (por ejemplo, cuando el análisis de competencia se usa para seleccionar o cribar nuevos anticuerpos diseñados con la función prevista de bloquear la unión de otro péptido o molécula que se une a CD38 (por ejemplo,

los compañeros de unión naturales de CD38 tales como CD31, también llamado antígeno CD31, EndoCAM, GPIIA, PECAM-1, molécula de adhesión de células plaquetarias/endoteliales o anticuerpo anti-CD38 de origen natural).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se une específicamente a uno o más residuos o regiones en CD38, pero tampoco reacciona de forma cruzada con otras proteínas con homología con CD38, tales como BST-1 (antígeno 1 de células estromales de médula ósea) y Mo5, también llamado CD157.

Típicamente, la falta de reactividad cruzada significa menos de aproximadamente 5% de inhibición competitiva relativa entre las moléculas cuando se evalúa mediante ELISA y/o análisis FACS usando cantidades suficientes de las moléculas en condiciones de ensayo adecuadas.

Los anticuerpos divulgados pueden encontrar uso para bloquear una interacción ligando-receptor o para inhibir la interacción del componente receptor. Los anticuerpos anti-CD38 de la invención pueden ser "bloqueantes" o "neutralizantes". Un "anticuerpo neutralizante" pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a CD38 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de CD38, por ejemplo, su capacidad para interactuar con ligandos, actividad enzimática y/o capacidad de señalización. La inhibición de la actividad biológica de CD38 puede evaluarse mediante uno o más de varios ensayos estándar *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica (véanse los ejemplos a continuación).

"Inhibe la unión" o "bloquea la unión" (por ejemplo, cuando se refiere a la inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 a CD38) abarca la inhibición/bloqueo tanto parcial como completo. La inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 a CD38 puede reducir o alterar el nivel o tipo normal de señalización celular que se produce cuando un compañero de unión de CD38 se une a CD38 sin inhibición o bloqueo. La inhibición y el bloqueo también pretenden incluir cualquier disminución medible en la afinidad de unión de un compañero de unión de CD38 a CD38 cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-CD38, en comparación con el ligando que no está en contacto con un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo un bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 a CD38 en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

Los anticuerpos anti-CD38 divulgados también pueden inhibir el crecimiento celular. "Inhibe el crecimiento" incluye cualquier disminución mensurable en el crecimiento celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-CD38, en comparación con el crecimiento de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, una inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

35 Métodos para producir los anticuerpos de la invención

La presente invención proporciona además métodos para producir los anticuerpos anti-CD38 divulgados. Estos métodos abarcan el cultivo de una célula huésped que contiene un ácido o ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos de la invención. Como apreciarán los expertos en la técnica, esto se puede hacer de varias formas, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. En algunas realizaciones, en el caso en el que los anticuerpos de la invención son anticuerpos tradicionales de longitud completa, por ejemplo, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en condiciones tales que se produce un anticuerpo y puede aislarse.

En general, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. Dichos polinucleótidos codifican para las regiones tanto variables como constantes de cada una de las cadenas pesada y ligera, aunque otras combinaciones también se contemplan en la presente invención de acuerdo con las composiciones descritas en este documento. La presente invención también contempla fragmentos de oligonucleótidos derivados de los polinucleótidos y secuencias de ácido nucleico divulgados complementarios a estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos pueden estar en forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácido nucleico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario, puede ser la cadena codificante (sentido) o no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en este documento o puede ser una secuencia codificante diferente, cuya secuencia, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica los mismos polipéptidos que el ADN proporcionado en este documento.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención se incorporan en vectores de expresión, que pueden ser extracromosómicos o diseñados para integrarse en el genoma de la célula huésped en la que se introduce. Los vectores de expresión pueden contener cualquier cantidad de secuencias reguladoras apropiadas (que incluyen, entre otras, secuencias de control de transcripción y traducción, promotores, sitios de unión ribosómica, potenciadores, orígenes de replicación, etc.) u otros componentes (genes de selección, etc.), todos los cuales están enlazados operativamente como es bien conocido en la técnica. En algunos casos, se usan dos ácidos nucleicos y cada uno se pone en un vector de expresión diferente (por ejemplo, cadena pesada en un primer vector de expresión, cadena ligera en un segundo vector de expresión) o alternativamente se

pueden poner en el mismo vector de expresión. Los expertos en la técnica se darán cuenta que el diseño del vector o vectores de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

- 5 En general, los ácidos nucleicos y/o la expresión se pueden introducir en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante usando cualquier método apropiado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de manera que la o las moléculas de ácido nucleico están operativamente ligadas a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada por procesos en la célula, integrados en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante resultante puede mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en medios de cultivo adecuados complementados con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), con lo que se producen el o los polipéptidos codificados. En algunos casos, las cadenas pesadas se producen en una celda y la cadena ligera en otra.
- 10 15 Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles a través de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias otras líneas celulares. Las células no mamíferas que incluyen, pero no se limitan a, bacterias, levaduras, insectos y plantas también pueden usarse para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos tales como vacas o pollos.
- 20 25 Se describen métodos generales para biología molecular de anticuerpos, expresión, purificación y cribado, por ejemplo, en Antibody Engineering, editado por Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 y 2010; Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5: 683-689; Maynard y Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2: 339-76; y Morrison, S. (1985) Science 229: 1202.
- 30 35 40 Los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos en la presente memoria se preparan como se conoce en la técnica, incluidas las técnicas utilizadas por Seattle Genetics (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 8.067.546, 8.039.273, 7.989.434, 7.851.437, 7.837.980 y 7.829.531, con referencia particular a fármacos, enlazadores y métodos de conjugación), Syntarga (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.705.045 y 7.<223>.837, con referencia particular a fármacos, enlazadores y métodos de conjugación), Medarex (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 8.034.959, 8.034.787, 7.968.586 y 7.847.105, con referencia particular a fármacos, enlazadores y métodos de conjugación), y otros bien conocidos en la técnica.

Aplicaciones e Indicaciones

- 45 Una vez elaborados, los anticuerpos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones, que incluyen el diagnóstico de enfermedades relacionadas con CD38 y el tratamiento de las mismas.

Condiciones relacionadas con CD38

- 50 55 60 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar una afección asociada con la proliferación de células que expresan CD38, que comprende administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito. En ciertas realizaciones, la afección es cáncer, y en realizaciones particulares, el cáncer es cáncer hematológico. En otras realizaciones particulares, la afección es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células plasmáticas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma de células B o linfoma de Burkitt.

- 65 Se sabe en la técnica que ciertas afecciones están asociadas con células que expresan CD38, y que ciertas afecciones están asociadas con la sobreexpresión, la expresión de alta densidad o la expresión sobreregulada de CD38 en las superficies de las células. Si una población de células expresa CD38 o no puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, determinación de citometría de flujo del porcentaje de células en una población determinada que están marcadas por un anticuerpo que se une específicamente a CD38 o ensayos inmunohistoquímicos, como se describe generalmente a continuación para aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, se puede considerar que una población de células en la que se detecta la expresión de CD38 en aproximadamente 10-30% de las células tiene una positividad débil para CD38; y una población de células en las que se detecta expresión de CD38 en más de aproximadamente 30% de las células puede considerarse una positividad definida para CD38 (como en Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356), aunque se pueden usar otros criterios para determinar si una población de células expresa CD38. La densidad de expresión en las superficies de las células puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, medición por citometría de flujo de la intensidad media de fluorescencia de células que se han marcado fluorescentemente usando anticuerpos que se unen específicamente a CD38.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la divulgación se aplican a un cáncer tal como un "cáncer hematológico", un término que se refiere a neoplasmas malignos de tejidos formadores de sangre y abarca leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Los ejemplos no limitantes de afecciones asociadas con la expresión de CD38 incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple (Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) Dürig et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32; Marinov et al. (1993), Neoplasma 40 (6): 355-8; y Jelinek et al. (2001), Br. J. Haematol. 115: 854- 61), leucemia linfoblástica aguda (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9 y Marinov et al. (1993), Neoplasma 40 (6): 355-8), leucemia mieloide crónica (Marinov y otros (1993), Neoplasma 40 (6): 355-8), leucemia mieloide aguda (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica o leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielógena aguda o leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia de células pilosas (HCL), síndromes mielodisplásicos (MDS) o leucemia mielógena crónica (CML-BP) en subtipo blástico y todos los subtipos de estas leucemias que se definen por técnicas morfológicas, histoquímicas e inmunológicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

15 "Neoplasma" o "afección neoplásica" se refiere a una afección asociada con la proliferación de células caracterizada por una pérdida de controles normales que da como resultado uno o más síntomas que incluyen crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión tisular local y metástasis.

20 En algunas realizaciones de la invención, el cáncer hematológico se selecciona del grupo de leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfocítica aguda (ALL).

25 Además, se sabe en la técnica que la expresión de CD38 es un indicador de pronóstico para pacientes con afecciones tales como, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B (Dürig et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; y Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32) y leucemia mielógena aguda (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9).

30 La CLL es la leucemia más común de adultos en el mundo occidental. La CLL implica la expansión clonal de linfocitos de aspecto maduro que involucran ganglios linfáticos y otros tejidos linfoideos con infiltración progresiva de médula ósea y presencia en la sangre periférica. La forma de células B (B-CLL) representa casi todos los casos.

B-CLL

35 La B-CLL es una enfermedad incurable caracterizada por un aumento progresivo de células de linaje B monoclonal anárquico que se acumulan en la médula ósea y la sangre periférica de forma prolongada durante muchos años. La expresión de CD38 se considera un factor independiente de pronóstico pobre para B-CLL. Hamblin et al., Blood 99: 1023-9 (2002).

40 La terapia estándar actual de B-CLL es paliativa y se lleva a cabo principalmente con el agente citostático clorambucilo o fludarabina. Cuando ocurren recaídas, a menudo se inicia una terapia de combinación que usa fludarabina, ciclofosfamida en combinación con rituximab (anticuerpo monoclonal contra CD20) o Campath (anticuerpo monoclonal contra CD52). Por lo tanto, existe una necesidad médica crítica no satisfecha para el tratamiento de B-CLL. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar B-CLL usando los anticuerpos anti-CD38 divulgados (y, como se describe a continuación, esto se puede hacer usando terapias de combinación que incluyen opcionalmente e independientemente cualquiera de los fármacos anteriores).

45 B-CLL se caracteriza por dos subtipos, indolente y agresivo. Estos fenotipos clínicos se correlacionan con la presencia o ausencia de mutaciones somáticas en el gen de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina (IgVH). Como se usa en el presente documento, la B-CLL indolente se refiere a un trastorno en un sujeto que tiene el gen de IgVH mutado y/o que presenta uno o más fenotipos clínicos asociados con la B-CLL indolente. Como se usa en el presente documento, la frase B-CLL agresiva se refiere a un trastorno en un sujeto que tiene IgVH no mutada y/o que presenta uno o más fenotipos clínicos asociados con B-CLL agresiva.

Mieloma múltiple

55 El mieloma múltiple es un trastorno maligno del linaje de células B caracterizado por proliferación neoplásica de células plasmáticas en la médula ósea. Los regímenes de tratamiento actuales exhiben tasas de respuesta moderadas. Sin embargo, solo se observan cambios marginales en la supervivencia global y la supervivencia media es de aproximadamente 3 años. Por lo tanto, existe una necesidad médica crítica insatisfecha para el tratamiento del mieloma múltiple. En algunas realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para tratar el mieloma múltiple usando los anticuerpos descritos.

CD38 se expresa altamente en células de plasma que son células B diferenciadas terminalmente.

65 La proliferación de células de mieloma causa una variedad de efectos, que incluyen lesiones líticas (agujeros) en el hueso, disminución del número de glóbulos rojos, producción de proteínas anormales (con el consiguiente daño al

riñón, los nervios y otros órganos), reducción de la función del sistema inmune y niveles elevados de calcio en la sangre (hipercalcemia).

5 Actualmente, las opciones de tratamiento incluyen quimioterapia, preferiblemente asociada cuando sea posible con autotrasplante de células madre (ASCT).

Gammapatía monoclonal de significado indeterminado y mieloma múltiple latente

10 En algunas realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para tratar la gammapatía monoclonal usando los anticuerpos descritos. En otras realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para tratar mieloma múltiple latente utilizando los anticuerpos descritos.

15 La gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS) y el mieloma múltiple latente (SMM) son trastornos asintomáticos premalignos caracterizados por la proliferación de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea y la ausencia de daño de los órganos terminales.

El mieloma múltiple latente (SMM) es un trastorno proliferativo asintomático de células plasmáticas con un alto riesgo de progresión a mieloma múltiple sintomático o activo (N. Engl. J. Med. 356 (25): 2582-2590 (2007)).

20 Los criterios de consenso internacional que definen SMM se adoptaron en 2003 y requieren que un paciente tenga un nivel de proteína M de >30 g/L y/o células plasmáticas clonales de médula ósea >10% (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)). El paciente no debe tener afectación de órganos o tejidos relacionados, incluidas lesiones óseas o síntomas (Br. J. Haematol., 121: 749-57 (2003)).

25 Estudios recientes han identificado dos subconjuntos de SMM; i) pacientes con evolución de la enfermedad y ii) pacientes con enfermedad no evolutiva (Br. J. Haematol. 121: 631-636 (2003)). Los criterios de consenso internacional que definen la MGUS requieren que un paciente tenga un nivel de proteína M <30 g/L, células plasmáticas de médula ósea <10% y la ausencia de afectación de órganos o tejidos relacionados, incluidas lesiones o síntomas óseos (Br. J. Haematol) 121: 749-57 (2003)).

30 SMM se asemeja a la gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS) ya que el daño de órgano terminal está ausente (N. Engl. J. Med. 356 (25): 2582-2590 (2007)). Clínicamente, sin embargo, SMM es mucho más probable que progrese a mieloma múltiple activo o amiloidosis a los 20 años (78% de probabilidad de SMM frente a 21% de MGUS) (N. Engl. J. Med. 356 (25): 2582-2590 (2007)).

35 La Figura 11 representa varias realizaciones de ADC diferentes. Como se describe en este documento, los residuos enlazadores pueden cambiar, incluyendo la composición de los aminoácidos, los enlazadores autoinmolantes, etc.

Conjugados de anticuerpo y fármaco

40 Los anticuerpos anti-CD38 de la invención se conjugan con fármacos para formar conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). En general, los ADC se utilizan en aplicaciones de oncología, donde el uso de conjugados anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos permite la administración dirigida de la fracción del fármaco a los tumores, lo que puede permitir una mayor eficacia, menor toxicidad, etc. Se proporciona una descripción general de esta tecnología en Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21: 5-13 (2010), Carter et al., Cancer J. 14 (3): 154 (2008) y Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13: 235-244 (2009).

45 De este modo, la invención proporciona anticuerpos anti-CD38 conjugados con fármacos. Generalmente, la conjugación se realiza por unión covalente con el anticuerpo, como se describe adicionalmente a continuación, y generalmente se basa en un enlazador, a menudo un enlace peptídico (que, como se describe más adelante, puede diseñarse para ser sensible a la escisión por proteasas en el sitio objetivo o no). Además, como se describió anteriormente, el enlace de la unidad de enlazador-fármaco (LU-D) puede realizarse por unión a cisteínas dentro del anticuerpo. Como apreciarán los especialistas en la técnica, el número de residuos de fármaco por anticuerpo puede cambiar, dependiendo de las condiciones de la reacción, y puede variar de 1:1 a 10:1 de fármaco:anticuerpo. Como apreciarán los expertos en la técnica, el número real es un promedio.

55 Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos anti-CD38 conjugados con fármacos. Como se describe a continuación, el fármaco del ADC puede ser cualquier cantidad de agentes, que incluyen, pero no se limitan a agentes citotóxicos tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacterial, en hongos, plantas o animales, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjunto). En otras realizaciones, la divulgación proporciona además métodos para usar los ADC.

60 Los fármacos para uso en la presente invención incluyen fármacos citotóxicos, particularmente los que se usan para la terapia del cáncer. Dichos fármacos incluyen, en general, agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, productos naturales y sus análogos. Los ejemplos de clases de agentes citotóxicos incluyen los inhibidores de enzimas tales

como inhibidores de dihidrofolato reductasa e inhibidores de timidilato sintasa, intercaladores de ADN, cortadores de ADN, inhibidores de topoisomerasa, familia de fármacos de antraciclina, fármacos de la vinca, mitomicinas, bleomicinas, nucleósidos citotóxicos, familia de fármacos de pteridina, diinenos, las podofilotoxinas, dolastatinas, maitansinoides, inductores de diferenciación y taxoles.

5 Los miembros de estas clases incluyen, por ejemplo, metotrexato, metopterina, dchlorometotrexate, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, citosina arabinósido, melfalán, leurosina, leurosidina, actinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, caminomicina, aminopterina, talismomicina, podofilotoxina y derivados de podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxanos incluido taxol, Taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, N8-acetilespermidina, camptotecina, caliqueamicina, esperamicina, ene-diinos, duocarmicina A, duocarmicina SA, caliqueamicina, camptotecina, maitansinoides (incluyendo DM1), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF) y maitansinoides (DM4) y sus análogos.

10 15 Las toxinas se pueden usar como conjugados anticuerpo-toxina e incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92 (19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic y Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos 20 por mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión al ADN o inhibición de la topoisomerasa.

25 Se contemplan conjugados de un anticuerpo anti-CD38 y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, tricoteceno, caliqueamicina y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

25 Maitansinoides

30 Los compuestos de maitansina adecuados para usar como residuos del fármaco maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al. (2002) PNAS 99: 7968-7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos. Como se describe a continuación, los fármacos pueden modificarse mediante la incorporación de un grupo funcionalmente activo tal como un grupo tiol o amina para la conjugación con el anticuerpo.

35 40 Los ejemplos de residuos de fármaco maitansinoide incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C-19-desclorado (patente de Estados Unidos No. 4.256.746) (preparado por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-desclorado (patentes de Estados Unidos Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando Streptomyces o Actinomyces o descloración usando LAH); y C-20-demetoxy, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de Estados Unidos No. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

45 50 Los ejemplos de residuos de fármaco de maitansinoide también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (patente de Estados Unidos No. 4.424.219) (preparada mediante la reacción de maitansinol con H2S o P2S5); C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH2OR) (patente de Estados Unidos No. 4.331.598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH2OH o CH2OAc) (patente de Estados Unidos No. 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia); C-15-hidroxi/aciloxi (patente de Estados Unidos No. 4.364.866) (preparada mediante la conversión de maitansinol por Streptomyces); C-15-metoxi (patentes de Estados Unidos Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora); C-18-N-desmetilo (patentes de Estados Unidos Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos No. 4.371.533) (preparada por la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

55 De uso particular son DM1 (divulgado en la patente de Estados Unidos No. 5.208.020, incorporada por referencia) y DM4 (divulgado en la patente de Estados Unidos No. 7.276.497, incorporada como referencia). Véase también una cantidad de derivados y métodos de maitansinoide adicionales en los documentos 5.416.064; WO/01/24763; 7,303,749; 7.601.354; USSN 12/631,508; WO02/098883; 6.441.163; 7.368.565; WO02/16368 y WO04/1033272.

60 65 Los ADC que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la patente europea EP 0 425 235 B1, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describen los ADC que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostraba actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*.

65 Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen ADC en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal TA.1 murino que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del

conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría incrementarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

5 Auristatinas y dolastatinas

10 En algunas realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo anti-CD38 conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolastatinas y derivados, las auristatinas (patentes de Estados Unidos Nos. 5.635.483 y 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45 (12): 3580-3584) y tienen anticancerígeno (patente de Estados Unidos No. 5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 2961-2965). La fracción del fármaco dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través del terminal N (amino) o el terminal C (carboxilo) de la fracción del fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

15 Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los residuos DE y DF del fármaco de monometilaristatina unidas al N-terminal, descritas en "Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research", Volumen 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en la publicación de patente de Estados Unidos No. 2005/0238648.

20 Un ejemplo de realización de auristatina es MMAE (mostrada en la Figura 10 en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco (véase la patente de Estados Unidos No. 6.884.869).

25 Otro ejemplo de realización de auristatina es MMAF, mostrada en la Figura 10, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco (documentos US 2005/0238649, 5.767.237 y 6.124.431).

30 Los ejemplos de realizaciones adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores (descritos adicionalmente en este documento) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab significa anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):

35 Típicamente, los residuos de fármaco basados en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los residuos de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: la patente de Estados Unidos No. 5.635.483; la patente de Estados Unidos No. 5.780.588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5: 859-863; y Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21 (7): 778-784.

45 Caliqueamicina

45 En otras realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. Por ejemplo, Mylotarg es el primer fármaco ADC comercial y utiliza caliqueamicina $\gamma 1$ como carga útil (véase la patente de Estados Unidos No. 4.970.198). Se describen derivados de caliqueamicina adicionales en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.264.586, 5.384.412, 5.550.246, 5.739.116, 5.773.001, 5.767.285 y 5.877.296, todas incorporadas expresamente por referencia. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir rupturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todos para American Cyanamid Company). Análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, $\gamma 1I$, $\alpha 2I$, $\alpha 2I$, N-acetil- $\gamma 1$, PSAG y $\theta 1I$ (Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos antes mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que puede conjugarse con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta en gran medida sus efectos citotóxicos.

60 Duocarmicinas

65 CC-1065 (véase la patente de Estados Unidos No. 4.169.888) y las duocarmicinas son miembros de una familia de antibióticos antitumorales utilizados en ADC. Estos antibióticos parecen funcionar a través del ADN alquilante de secuencia selectiva en el N3 de adenina en el surco menor, lo que inicia una cascada de eventos que resultan en apoptosis.

Los miembros importantes de las duocarmicinas incluyen la duocarmicina A (patente de los Estados Unidos No. 4.923.990) y la Duocarmicina SA (patente de los Estados Unidos No. 5.101.038), y un gran número de análogos como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.517.903; 7.691.962; 5.101.038; 5.641.780; 5.187.186; 5.070.092; 5.070.092; 5.641.780; 5.101.038; 5.084.468; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; los 5 documentos WO2007/089149; WO2009/017394A1; las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.703.080; 6.989.452; 7.087.600; 7.129.261; 7.498.302; y 7.507.420.

Otros agentes citotóxicos

10 Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.053.394 y 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos No. 5.877.296).

15 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena diftérica A, fragmentos activos no enlazantes de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los 20 tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención además contempla un ADC formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa, DNasa).

25 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radiactivos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjungados. Los ejemplos incluyen At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu.

30 Las etiquetas de radio u otras etiquetas se pueden incorporar en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Las etiquetas como Tc99m o I123, Re186, Re188 e In111 se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El litio 90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 se puede usar para incorporar Yodo 123. "Anticuerpos monoclonales en inmunoescintografía" (Chatal, CRC Press 35 1989) describe otros métodos en detalle.

35 Para composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos, la carga del fármaco está representada por p, el número promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo en la preparación de reacciones de conjugación 40 se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de conjugados de anticuerpo y fármaco en términos de p también puede determinarse.

45 En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco homogéneos donde p es un cierto valor de conjugados de anticuerpo-fármaco con otras cargas de fármaco se puede lograr por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. En ejemplos de realizaciones, p es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 o una fracción de los mismos.

50 La generación de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco pueden incluir un anticuerpo anti-CD38 como la unidad de anticuerpo, un fármaco y, opcionalmente, un ligador que une al fármaco y al agente de unión.

55 Se encuentran disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/o enlazadores a agentes de unión. Esto se puede lograr por reacción de los residuos de aminoácidos del agente de unión, por ejemplo, molécula de anticuerpo, que incluye los grupos amina de lisina, los grupos ácidos carboxílicos libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos residuos de los aminoácidos aromáticos. Un método no específico comúnmente utilizado de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo.

60 También está disponible para la unión de fármacos a agentes de unión la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con periyodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi, formando así un aldehído que luego reacciona con el agente de unión. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. Los isotiocianatos también se pueden usar como agentes de acoplamiento para 65

unir covalentemente fármacos a agentes de unión. El experto en la técnica conoce otras técnicas y está dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones, un compuesto intermedio, que es el precursor del enlazador, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones apropiadas. En otras realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el compuesto intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el compuesto intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar subsiguientemente con un anticuerpo anti-CD38 de la invención en condiciones apropiadas.

Se entenderá que también se pueden realizar modificaciones químicas en el compuesto deseado con el fin de hacer que las reacciones de ese compuesto sean más convenientes para los propósitos de preparar conjugados de la invención. Por ejemplo, un grupo funcional, por ejemplo, amina, hidroxilo o sulfhidrilo, pueden agregarse al medicamento en una posición que tenga un efecto mínimo o aceptable sobre la actividad u otras propiedades del medicamento.

15 Unidades enlazadoras

Típicamente, los compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco comprenden una unidad enlazadora entre la unidad del fármaco y la unidad del anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares o extracelulares, de manera que la escisión del enlazador libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el entorno apropiado. Por ejemplo, los tumores sólidos que secretan ciertas proteasas pueden servir como el objetivo del enlazador escindible; en otras realizaciones, son las proteasas intracelulares las que se utilizan. En otras realizaciones más, la unidad de unión no es escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, mediante degradación de anticuerpos en lisosomas.

En algunas realizaciones, el enlazador es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde mediante una peptidasa o enzima proteasa intracelular, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas realizaciones, el enlazador de peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud o más.

Los agentes de escisión pueden incluir, sin limitación, cathepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos dando como resultado la liberación de fármaco activo dentro de las células objetivo (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123). Los enlazadores peptídico que son escindibles por las enzimas que están presentes en las células que expresan CD38. Por ejemplo, se puede usar un enlazador de peptídico que es escindible por la proteasa dependiente de tiol cathepsina B, que está altamente expresada en tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: X)). Se describen otros ejemplos de dichos enlazadores, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 6.214.345.

En algunas realizaciones, el enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit o un enlazador Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el enlazador val-cit).

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazador sensible al pH hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazador labil en medio ácido que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acónica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.122.368, 5.824.805, 5.622.929, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123, Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661). Dichos enlazadores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como los que están en la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazone (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.622.929).

En otras formas de realización adicionales, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). En la técnica se conocen diversos enlaces disulfuro, que incluyen, por ejemplo, aquellos que se pueden formar usando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47: 5924- 5931; Wawrzynczak et al., en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (CW Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Véase también la patente de los Estados Unidos No. 4.880.935).

En otras realizaciones, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387-93), un enlazador de maleimidobenzoilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10): 1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10): 1305-12).

En otras formas de realización adicionales, la unidad de unión no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo. (Véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0238649).

En muchas realizaciones, el enlazador es autoinmolable. Como se usa en el presente documento, el término "espaciador autoinmolable" se refiere a una fracción química bifuncional que es capaz de unir de manera covalente dos residuos químicos espaciados en una molécula tripartita estable. Se separará espontáneamente de la segunda fracción química si se escinde su enlace a la primera fracción. Véase, por ejemplo, los documentos WO 2007059404A2; WO06110476A2; WO05112919A2; WO2010/062171; WO09/017394; WO07/089149; WO 07/018431; WO04/043493 y WO02/083180, que están dirigidos a conjugados de sustrato escindibles por fármacos en los que el fármaco y el sustrato escindible están opcionalmente unidos a través de un enlazador autoinmolador.

A menudo, el enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en este documento, "no es sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que no más de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 3% o no más de aproximadamente 1% de los enlazadores, en una muestra de compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco, se escinden cuando el compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco se presenta en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma).

Se puede determinar si un enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y luego cuantificar la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el enlazador promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio de la fracción del agente terapéutico-enlazador del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco como se describe en este documento). En otras realizaciones adicionales, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el compuesto de auristatina como con los anticuerpos anti-CD38 de la invención.

Una variedad de ejemplos de enlazadores que se pueden usar con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004-010957, la publicación de la solicitud de patente los Estados Unidos No. 2006/0074008, la publicación de la solicitud de patente los Estados Unidos No. 20050238649 y la publicación de la solicitud de patente los Estados Unidos No. 2006/0024317.

Carga del fármaco

La carga de fármaco está representada por p y es el número promedio de residuos de fármaco por anticuerpo en una molécula. La carga de medicamento ("p") puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos (D) por anticuerpo, aunque con frecuencia el número promedio es una fracción o un decimal. Generalmente, la carga de fármaco de 1 a 4 es frecuentemente útil, y de 1 a 2 también es útil. Los ADC de la invención incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de residuos de fármaco, de 1 a 20. El número promedio de residuos de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas y ensayo de ELISA.

También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco se puede lograr por medios tales como electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en los ejemplos de las realizaciones anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En ciertas realizaciones, una mayor carga de fármaco, por ejemplo, p > 5, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; o de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. De hecho, se ha demostrado que para ciertos ADC, la proporción óptima de residuos de fármaco por anticuerpo puede ser menor que 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase el documento US 2005-0238649 A1.

En ciertas realizaciones, menos del máximo teórico de residuos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el compuesto intermedio de fármaco-enlazador o reactivo enlazador, como se analiza a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que pueden estar unidos a un residuo de

fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos reactivos tiol de cisteína. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar del compuesto intermedio de fármaco-enlazador o reactivo de unión con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de conjugación o la temperatura, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína, (iv) diseñando mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo que el número y posición de los residuos de cisteína se modifique para controlar el número y/o la posición de las uniones enlazador-fármaco (tales como tioMab o tioFab preparadas como se describe en este documento y en WO2006/034488).

Se debe entender que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un compuesto intermedio de fármaco-enlazador o reactivo enlazador seguido por un reactivo de residuo de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más residuos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante un ensayo doble de anticuerpos por ELISA, que es específico para anticuerpos y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica.

En algunas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga se puede aislar de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

25 Métodos para determinar el efecto citotóxico de los ADC.

Se conocen métodos para determinar si un fármaco o conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo y fármaco puede medirse por: exposición de células de mamífero que expresan una proteína objetivo del conjugado de anticuerpo y fármaco en un medio de cultivo celular; cultivar las células durante un período de aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células pueden usarse para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de caspasas) del conjugado de anticuerpo-fármaco.

Para determinar si un conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan un antígeno objetivo a una densidad de 5.000 células/pozo de una siembra en placa de 96 pozos pueden cultivarse durante un período de 72 horas y exponerse a 0,5 µCi de ³H-timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas. La incorporación de ³H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y en ausencia del conjugado de anticuerpo-fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis suele ir acompañada de una mayor permeabilidad de la membrana plasmática; hinchamiento de la célula y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza típicamente por la formación de ampollas en la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos sobre las células cancerosas indica que un conjugado de anticuerpo y fármaco es útil en el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular se puede medir determinando en una célula la absorción de un colorante tal como rojo neutro, azul de tripano o azul ALAMAR^{MR} (véase, por ejemplo, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3: 473-476). En tal ensayo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan, y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. El colorante que se une a la proteína sulfurodamina B (SRB) también puede usarse para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-12).

Alternativamente, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamífero detectando células vivas, pero no las muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65: 55-63).

La apoptosis se puede cuantificar midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Ejemplos de tales ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, no. 2, págs. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

La apoptosis también puede determinarse midiendo cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la absorción de ciertos colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., Eds., 1992, páginas 3.17.1-3.17.16). Las células también se pueden marcar con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células observadas por la condensación de la cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásica, aumento de la formación de ampollas en la membrana y contracción celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse en los compartimentos adjunto y "flotante" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimentos se pueden recoger eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2.000 rpm) y detectando apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55: 3110-16).

In vivo, el efecto de una composición terapéutica del anticuerpo anti-CD38 de la invención se puede evaluar en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden usarse modelos de cáncer xenogénico, en los que explantes de cáncer o tejidos de xenoinjerto pasados se introducen en animales inmunodeprimidos, tales como ratones desnudos o SCID (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). La eficacia se puede medir usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, la regresión del tumor o la metástasis, y similares.

Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que cuando se combina con la composición terapéutica retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no es reactivo con el sistema inmune del paciente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de varios portadores farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas estériles reguladas con fosfato, agua bacteriostática y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Edición, A. Osol., Ed., 1980).

30 Composiciones de anticuerpos para administración *in vivo*

Las formulaciones de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecil dimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR} o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar anticuerpos con otras especificidades. Alternativamente, o, además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden ser incluidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en la 16^a edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deberían ser estériles, o casi estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinil alcohol)), poliláctidas (patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etyl-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuproliida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

20 Modalidades de administración

Los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerobroespinal, subcutánea, intraarticular, intraspinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

Modalidades de tratamiento

En los métodos de la divulgación, la terapia se usa para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejora en la enfermedad o condición, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad o condición. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un aumento en la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas; (5) inhibición (es decir, ralentización hasta cierto punto, preferiblemente detención) del crecimiento tumoral; (6) una mayor tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o condición.

Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada se pueden determinar mediante criterios de respuesta estandarizados específicos para esa enfermedad o condición. La respuesta tumoral puede evaluarse para detectar cambios en la morfología tumoral (es decir, carga tumoral general, tamaño del tumor y similares) utilizando técnicas de detección como la imagenología por resonancia magnética (MRI), la obtención de imágenes radiográficas, la tomografía computarizada (TC), imagenología de barrido óseo, endoscopia y biopsia tumoral que incluye aspiración de médula ósea (BMA) y conteo de células tumorales en la circulación.

Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Por lo tanto, para tumores de células B, el sujeto puede experimentar una disminución en los denominados síntomas B, es decir, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria. Para afecciones premalignas, la terapia con un agente terapéutico anti-CD38 puede bloquear y/o prolongar el tiempo antes del desarrollo de una afección maligna relacionada, por ejemplo, el desarrollo de mieloma múltiple en sujetos que padecen gammopathía monoclonal de significado indeterminado (MGUS).

Una mejora en la enfermedad se puede caracterizar como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF) o proteína monoclonal anormal en el caso del mieloma.

Dicha respuesta puede persistir durante al menos 4 a 8 semanas, o a veces 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la divulgación. Alternativamente, una mejoría en la enfermedad se puede categorizar como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se pretende al menos aproximadamente un 50% de disminución en toda carga tumoral medible (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que pueden persistir durante 4 a 8 semanas, o de 6 a 8 semanas.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una "cantidad terapéuticamente efectiva" de los medicamentos usados. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado.

5 Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos para provocar una respuesta deseada en el individuo. También es una cantidad terapéuticamente eficaz en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo.

10 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos.

15 Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o

20 vía de administración particular seleccionada.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de la unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

30 La especificación para las formas unitarias de dosificación de la presente invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

35 Las dosificaciones eficientes y los regímenes de dosificación para los anticuerpos anti-CD38 usados en la presente invención dependen de la enfermedad o condición a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la técnica.

40 Un ejemplo de intervalo no limitativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 usado en la presente invención es aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o más, tal como una dosis de 1 a 20 mg/kg, por ejemplo, una dosis de 5 a 20 mg/kg, por ejemplo, una dosis de 8 mg/kg.

45 Un profesional médico con experiencia normal en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, un médico o un veterinario podría iniciar dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

50 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra por infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/kg, tal como de 200 a 400 mg/kg. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

55 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra por infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, si se requiere para reducir los efectos secundarios que incluyen toxicidad.

60 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra en una dosificación semanal de 250 mg a 2.000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1.000 mg, 1.500 mg o 2.000 mg, hasta por 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Tal régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, extrayendo una muestra biológica y usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a la región de unión al antígeno del anticuerpo anti-CD38.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD38 se administra una vez a la semana durante 2 a 12 semanas, tal como durante 3 a 10 semanas, tal como durante 4 a 8 semanas.

5 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

10 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo anti-CD38 seguido de una infusión de un anticuerpo anti-CD38 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días más tarde.

15 Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar como una dosificación diaria de un anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o alternativamente, al menos uno de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-CD38 de las mismas se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecano, topotecano, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos, y doxorrubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazine, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercaladores de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercaladores de ADN y generadores de radicales libres tal como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea).

25 30 Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (por ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo, mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib); inhibidores de NF-κB, que incluyen inhibidores de IκB quinasa; 35 anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y por lo tanto regulan negativamente la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que están reguladas positivamente, sobreexpresadas o activadas en cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se pueden usar antes de, al mismo tiempo con, o después del tratamiento con Velcade® (bortezomib).

Usos diagnósticos

45 Los anticuerpos anti-CD38 proporcionados también encuentran uso en la formación de imágenes *in vivo* o *in vitro* de tumores u otros estados patológicos asociados con CD38. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en este documento se usan tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o para el diagnóstico solamente. Cuando se usan anticuerpos anti CD38 tanto para diagnóstico como para tratamiento, algunas realizaciones se basan en dos anticuerpos anti-CD38 diferentes para dos epítopos diferentes, de manera que el anticuerpo de diagnóstico no compite por la unión con el anticuerpo terapéutico, aunque en algunos casos el mismo anticuerpo se 50 puede usar para ambos. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo Ab19 se usa de forma diagnóstica (generalmente se etiqueta como se analiza a continuación) mientras que Ab79 se usa terapéuticamente, o viceversa. De este modo, en la invención se incluyen composiciones que comprenden un anticuerpo de diagnóstico y un anticuerpo terapéutico, y en algunas realizaciones, el anticuerpo de diagnóstico se etiqueta como se describe en este documento. Además, la composición de anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico también se puede 55 coadministrar con otros fármacos como se describe en este documento.

60 En muchas realizaciones, se marca un anticuerpo de diagnóstico. Por "marcado" en la presente memoria se entiende que los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una pantalla o procedimiento de diagnóstico. En general, las etiquetas se dividen en varias clases: a) etiquetas inmunes, que pueden ser un epítopo incorporado como compañero de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, c) etiquetas de moléculas pequeñas, que puede incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de marcado, y d) etiquetas tales como partículas (que incluyen burbujas para el etiquetado por ultrasonido) o etiquetas paramagnéticas que permiten la formación de imágenes del cuerpo. Las etiquetas pueden incorporarse en los anticuerpos en cualquier posición y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de la proteína, como se conoce en la técnica.

- El diagnóstico puede realizarse *in vivo*, mediante la administración de un anticuerpo de diagnóstico que permite la formación de imágenes del cuerpo completo como se describe a continuación, o *in vitro*, en muestras extraídas de un paciente. "Muestra" en este contexto incluye cualquier cantidad de cosas, incluyendo, pero sin limitarse a, fluidos corporales (que incluyen, entre otros, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudoración y semen), así como muestras de tejido como resultado de biopsias de tejidos relevantes.
- En algunas realizaciones, se lleva a cabo una formación de imágenes *in vivo*, que incluye, pero no se limita a, ultrasonidos, tomografías computarizadas, rayos X, imágenes por resonancia magnética y PET, así como técnicas ópticas, tales como las que usan etiquetas ópticas para tumores cerca de la superficie del cuerpo.
- La formación de imágenes *in vivo* de tumores asociados con CD38 puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede usar marcación con ⁹⁹Tc o marcación con otro isótopo que emite rayos beta para marcar anticuerpos anti-CD38. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de imágenes por resonancia magnética (MRI) para mejorar las imágenes sobre las técnicas de cámara gamma. Se describen métodos y principios de inmunoescintigrafía similares, por ejemplo, en Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Gennaro et al., (eds.), págs. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", en Biotechnology and Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993).
- En una realización, la presente divulgación proporciona un método de formación de imágenes *in vivo* en el que un anticuerpo anti-CD38 se conjuga con un agente promotor de la detección, el anticuerpo conjugado se administra a un huésped, tal como mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se analiza la presencia y la ubicación del anticuerpo marcado en el huésped. Mediante esta técnica y cualquier otro método de diagnóstico proporcionado en este documento, la presente invención proporciona un método para el cribado de la presencia de células relacionadas con la enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano.
- Para la formación de imágenes de diagnóstico, los radioisótopos se pueden unir a un anticuerpo anti-CD38 directamente o indirectamente usando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermedios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.057.313). En tales ensayos de diagnóstico que implican anticuerpos anti-CD38 conjugados con radioisótopos, la dosis de anticuerpo anti-CD38 conjugado administrada al paciente se mantiene típicamente en un nivel tan bajo como sea posible mediante la elección del isótopo para la mejor combinación de vida media mínima, retención mínima en el cuerpo, y cantidad mínima de isótopo, lo que permitirá la detección y medición precisa.
- Además de los radioisótopos y los agentes radiopacos, los métodos de diagnóstico pueden llevarse a cabo usando anticuerpos anti-CD38 que están conjugados con colorantes (tales como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos fluorescentes o moléculas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para imágenes de resonancia magnética (MRI) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.331.175, que describe técnicas de MRI y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente potenciador de MRI). Dichos agentes de diagnóstico/detección se pueden seleccionar de agentes para uso en formación de imágenes por resonancia magnética y compuestos fluorescentes.
- Para cargar un anticuerpo anti-CD38 con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tiene una cola larga a la que están unidos una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como una polilisina, polisacárido u otra cadena con formación de derivados o que puede formar derivados que tenga grupos colgantes a los que se pueden unir grupos quelantes tales como, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares conocidos por ser útiles para este propósito.
- Los quelatos se pueden acoplar a anticuerpos anti-CD38 usando procesos químicos convencionales. Un quelato normalmente se une a un anticuerpo anti-CD38 mediante un grupo que permite la formación de un enlace con la molécula con una pérdida mínima de inmunorreactividad y agregación mínima y/o entrecruzamiento interno.
- Los ejemplos de combinaciones de metal-quelato potencialmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico en el intervalo de energía general de 60 a 4.000 keV, tales como ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²⁴I, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ¹¹¹En, ⁶⁷Ga, ⁹⁹Tc, ⁹⁴Tc, ¹¹C, ¹³N, ⁵O y ⁷⁶Br, para formación de imágenes con ondas de radio.
- Las etiquetas incluyen un radionucleido, un agente de contraste radiológico, un ion paramagnético, un metal, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un agente de contraste de ultrasonido y un agente fotoactivo. Dichos agentes de diagnóstico son bien conocidos y se puede usar cualquier agente de diagnóstico conocido de este tipo. Los ejemplos no limitantes de agentes de diagnóstico pueden incluir un radionúclido tal como ¹¹⁰In, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F, ⁵²Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁴mTc, ⁹⁹mTc, ¹²⁰I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴

^{158}Gd , ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , ^{52}mMn , ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb , ^{83}Sr u otros emisores γ , β , o emisores de positrones.

5 Los iones paramagnéticos de uso pueden incluir cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). Los agentes de contraste metálicos pueden incluir lantano (III), oro (III), plomo (II) o bismuto (III).

10 Los agentes de contraste de ultrasonido pueden comprender liposomas, tales como liposomas llenos de gas. Los agentes de diagnóstico radiopacos se pueden seleccionar a partir de compuestos, compuestos de bario, compuestos de galio y compuestos de talio.

15 Estos quelatos y quelatos similares, cuando forman complejos con metales no radiactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, pueden ser útiles para los métodos de diagnóstico por MRI en relación con los anticuerpos anti-CD38. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se utilizan con una variedad de metales y radiometales, en particular con radionucleidos de galio, litio y cobre, respectivamente. Tales complejos metal-quelato pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Otros quelatos de tipo anillo tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para nucleóidos de unión estable, tales como ^{223}Ra también pueden ser adecuados en métodos de diagnóstico.

20 Por tanto, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpos anti-CD38 de diagnóstico, en los que el conjugado de anticuerpo anti-CD38 está conjugado con un agente de contraste (tal como para imágenes de resonancia magnética, tomografía computarizada o agente intensificador de contraste por ultrasonido) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo que emite γ , β , α , electrón Auger o positrón.

25 Los anticuerpos anti-CD38 también pueden ser útiles, por ejemplo, en detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo típicamente se marcará con un residuo detectable para ensayos *in vitro*. Como apreciarán los expertos en la técnica, existe una amplia variedad de etiquetas adecuadas para su uso en pruebas *in vitro*. Los colorantes adecuados para uso en este aspecto de la invención incluyen, entre otros, complejos de lantánidos fluorescentes, que incluyen los de Europio y Terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, puntos cuánticos (también denominados como "nanocrystalles", véase la solicitud de patente de los Estados Unidos con serial No. 09/315.584, incorporada aquí como referencia), pireno, verde de malaquita, estilbeno, amarillo Lucifer, Cascade Blue^{MR}, rojo Texas, colorantes Cy (Cy3, Cy5, etc.), colorantes Alexa (incluidos Alexa, ficoeritrina, bodipy y otros descritos en la 6^a edición del Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland, incorporados expresamente por referencia).

35 Los tejidos teñidos pueden evaluarse a continuación para contar la radioactividad como un indicador de la cantidad de péptidos asociados a CD38 en el tumor. Las imágenes obtenidas mediante el uso de tales técnicas se pueden usar para evaluar la biodistribución de CD38 en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo, en el contexto del uso de CD38 como biomarcador para la presencia de células cancerosas invasivas.

Artículos de fabricación

40 En otras realizaciones, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica).

45 50 55 El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta en, o asociada con, el contenedor indica que la composición se usa para tratar la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

Ejemplos

60 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención.

65 Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que codifican CD38 humana, de mono cynomolgus y de ratón

Para construir un vector que expresa CD38 humana (huCD38), se aisló un polinucleótido que codifica huCD38 a partir de ADNc obtenido a través de Origene Technologies Trueclone® humano. El huCD38 aislado se clonó en un vector de expresión estable (XOMA, Inc.) que contenía el gen de resistencia a neomicina (neo^R), que permitió la

selección de transfectantes resistentes a G418 (Geneticina). El gen huCD38 presente en los transfectantes seleccionados se secuenció para identificar cualquier error de secuencia. Los errores en la secuencia que se desvió del GenBank acceso NM_001775 se corrigieron mediante mutagénesis dirigida a sitio por PCR. El ADN del vector final se confirmó por secuenciación 5'.

5 Para construir un vector que exprese CD38 de mono cynomolgus (cyCD38), se aisló un polinucleótido que codifica cyCD38 a partir del ADN obtenido del ADNc del tejido de bazo normal, de mono (cynomolgus), del Biochain Institute. El cyCD38 aislado se clonó en un vector de expresión estable (XOMA, Inc.) que contenía el gen neo^R, que permitió la selección de transfectantes resistentes a G418 (Geneticina). El gen cyCD38 presente en los transfectantes seleccionados se secuenció para identificar cualquier error de secuencia. Los errores en la secuencia que se desvió del GenBank acceso AY555148 se corrigieron mediante mutagénesis dirigida por PCR. El ADN del vector final se confirmó por secuenciación.

10 15 Para construir un vector que expresa CD38 de ratón (moCD38), se aisló un polinucleótido que codifica moCD38 de ADN obtenido a través de la colección TrueORF de Origene. El moCD38 aislado se clonó en un vector de expresión estable (XOMA, Inc.) que contenía el gen neo^R, lo que permitió la selección de transfectantes resistentes a G418 (Geneticina). El gen moCD38 presente en los transfectantes seleccionados se secuenció para identificar cualquier error de secuencia. Los errores en la secuencia que se desvió del GenBank acceso NM_007646 se corrigieron mediante mutagénesis dirigida al sitio por PCR. El ADN del vector final se confirmó por secuenciación.

20 Ejemplo 2: Desarrollo de células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan CD38

Para el desarrollo de células CHO que expresan huCD38, muCD38 y cyCD38, las células CHO se transfectaron con ADN linealizado. Después de una semana en la selección, las células se clasificaron por citometría de flujo y las células que expresaban huCD38, muCD38 o cyCD38 más altas (superior al 15%) se sembraron en placas de 96 pozos para generar colonias individuales. Las células restantes también se sembraron bajo selección para generar colonias de respaldo. Aproximadamente 12-14 días después de la siembra en placa, se identificaron colonias individuales y se transfirieron a placas de 96 pozos profundos. Los clones se criaron por análisis FACS después del segundo pase. Los clones productores superiores se pasaron y se expandieron para agitar los matraces. Los 2 clones superiores se congelaron y/o se cultivaron para la prueba de AVA de micoplasma y ampliación proporcional.

30 35 Para construir un informador de luciferasa para modelos de xenoinjerto diseminados, se usó un vector comercial que contiene el promotor de CMV/el gen de luciferasa/el marcador seleccionable de neomicina (Promega, Madison, WI) para generar una línea transfectante estable en células de linfoma de Daudi Burkitt.

Ejemplo 3: Bibliotecas de presentación en fagos y selección de agentes que se unen a CD38

40 La selección del anticuerpo específico objetivo de una biblioteca de presentación en fago se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos por Marks et al. (2004, Methods Mol. Biol. 248: 161-76). En resumen, la biblioteca de presentación en fago se incubó con 100 pmoles de CD38 biotinilada a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se capturó el complejo formado usando 100 µl de suspensión de perlas de estreptavidina (DYNABEADS® M-280 estreptavidina, Invitrogen). Los fagos no específicos se eliminaron lavando las perlas con regulador de lavado (leche al 5% en PBS). Los fagos unidos se eluyeron con 0,5 mL de trietilamina (TEA) 100 nM y se neutralizaron inmediatamente mediante la adición de un volumen igual de TRIS-Cl 1 M, pH 7,4. El conjunto de fagos eluidos se usó para infectar células de E. coli TG1 que crecían en fase logarítmica y se rescató el fagémido como se describe en Marks et al., Id. La selección se repitió para un total de tres rondas.

45 50 Alternativamente, las bibliotecas de presentación en fagos se criaron frente a CD38 inmovilizada (R & D Systems) para identificar un panel de fragmentos de anticuerpo con la capacidad de unirse a CD38. El barrido se llevó a cabo utilizando protocolos estándar (véase, por ejemplo, Methods in Molecular Biology, volumen 178: Antibody Phage Display: Methods and Protocols Editado por: PM O'Brien y R. Aitken, Humana Press; "Panning of Antibody Phage-Display Libraries", "Coomber, DWJ, páginas 133-145, y " Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens", Chames et al., páginas 147-157). En resumen, se revistieron tres pozos de una placa NUNC® MAXISORP con 50 µL de CD38 recombinante (R & D Systems) a una concentración de 10 µg/mL en PBS. Despues de una noche de incubación a 4°C, los sitios de unión libre se bloquearon con leche al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 200 µL de biblioteca de fagos en leche al 5%/PBS a los pozos bloqueados y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente una a dos horas. Los pozos se lavaron y el fago unido se eluyó utilizando métodos estándar (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecule Cloning: A Laboratory Manual, 3^a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). El fago eluido se amplificó infectando células huésped TG1 de E. coli en fase de crecimiento logarítmico. Las células TG 1 infectadas se recuperaron por centrifugación a 2.500 RPM durante cinco minutos, se sembraron sobre placas de agar-glucosa al 2% - 2YT-ampicilina de 15 cm y se incubaron a 30°C durante la noche. El proceso de cribado se repitió utilizando el fago amplificado. El ciclo de paneo, elución y amplificación se repitió durante tres rondas.

55 60 65 Después de completar el paneo, se usaron colonias individuales de las células TG1 cultivadas en placa para inocular los medios en placas de 96 pozos. Los microcultivos se desarrollaron hasta una OD600 de 0,6, en cuyo punto se

indujo la expresión de scFv soluble mediante la adición de IPTG 1 mM y la incubación durante la noche en un agitador a 30°C. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación y el extracto periplasmático se usó para ensayar la unión de scFv a CD38 inmovilizado usando un ensayo de ELISA estándar y un ensayo de unión a FACS.

- 5 Para el cribado de unión a FACS, se usaron células CHO que expresan establemente CD38 para seleccionar scFvs en extracto periplasmático (PPE) por su capacidad para unirse a CD38 nativa, unida a la membrana. Transfectantes originales y CHO (líneas celulares que expresan CD38 humana o CD38 de cyno o CD38 de ratón) se resuspendieron por separado a 2×10^6 células/mL en PBS (Life Technologies), BSA al 0,5% (Sigma Aldrich) y NaN3 al 0,1% (Sigma Aldrich) (regulador de FACS). Las células CHO originales que no expresan CD38 se usaron como control negativo. Se sembraron en placa de 96 pozos con fondo en forma de V 25 µL de alícuotas de las células (Costar Cat # 3897) y se añadieron 25 µL de extracto periplasmático que contenía el fragmento de anticuerpo scFv marcado con myc a las células, luego la mezcla se incubó a 4°C por 30 minutos. Las células se lavaron a continuación dos veces, después de lo cual el sedimento se resuspendió en 25 µL de anti c-myc de ratón (1/1.000 en regulador FACS) (Roche) y se incubó de nuevo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron luego dos veces y se resuspendieron en 25 µL de IgG-PE anti-ratón a una dilución 1/200 en regulador FACS (Jackson Labs) y se incubaron de nuevo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron luego dos veces para eliminar el exceso de anticuerpo no unido y se resuspendieron en 70 µL de regulador FACS y se analizaron en un BD FACScan®. Los datos adquiridos se evaluaron utilizando el software FlowJo (TreeStar, Inc.). Las muestras positivas se identificaron comparando la intensidad de fluorescencia media de la célula CHO transfectada con CD38 en relación con la intensidad de fluorescencia media de la línea celular CHO original (CD38).

20 Los clones de anticuerpos que se unieron a CD38 humana se secuenciaron para identificar clones únicos. A continuación, los clones de scFV únicos se clasificaron de acuerdo con las constantes de disociación determinadas mediante el análisis de Biacore®. Se inmovilizaron 200RU a 500RU de CD38 recombinante humana (cat. 2404-AC de R & D Systems o equivalente) se inmovilizaron mediante química de acoplamiento de amina estándar (Biacore®) a un chip CM5 o equivalente. También se preparó un punto de referencia que se activó y luego se bloqueó sin la inmovilización de la proteína. Esto se hizo diluyendo el antígeno hasta 1-3 µg/mL en regulador de acetato, pH 5,0, e inyectando sobre la superficie activada hasta que se inmovilizó el nivel requerido (3-5) minutos. Se bloqueó luego la superficie con etanolamina. Los extractos periplásmicos se diluyeron uno a uno con el regulador de ensayo HEPES 25 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM (ácido etilendiaminotetraacético) y polisorbato 20 al 0,05% a pH 7,4 con 2 mg/mL de BSA (albúmina de suero bovino). El extracto periplasmático diluido se inyectó sobre las superficies de resonancia de plasmón superficial (SPR) a los 30 minutos durante 300 segundos con un tiempo de disociación adicional de 900 segundos monitorizados. La regeneración se realizó con una única inyección de 8 segundos de HCl 30 100 mM. Los datos de la referencia sp, pts se restaron de los datos de la superficie activa, luego las curvas de disociación se ajustaron usando el modelo de disociación 1:1 en el software Biacore® T100.

35 Los clones scFv de alto rango se convirtieron en anticuerpos IgG1. Se repitió el cribado de unión a FACS en los clones reformateados con IgG1 usando células CHO originales y células CHO que expresan CD38 humana, murina y de cynomolgus para asegurar que se retuvieran las propiedades de unión y para evaluar la reactividad cruzada de las especies. La caracterización por FACS de clones reformados con IgG se realizó como se describió anteriormente, pero las etapas que consisten en la adición de anticuerpo anti-c-myc y anti-IgG-PE de ratón se reemplazaron por una única etapa en la que se detectó la unión de IgG humana de longitud completa mediante la adición de IgG antihumana conjugada con ficoeritrina (Jackson Labs).

40 Ejemplo 4: Ensayos basados en células *in vitro* de clones reformateados con IgG

45 Se reformatearon aproximadamente 150 clones como anticuerpos IgG1 humanos y cinco (Ab19, Ab43, Ab72, Ab79 y Ab110) se evaluaron completamente usando un panel de ensayos, como se describe a continuación. El rendimiento de los clones reformateados de IgG en ambos ensayos *in vitro* e *in vivo* se comparó con dos anticuerpos, BMTK4-1 (también llamado Punto de referencia 1, BM-1 o BMTK-1) (SEQ ID NOs: 24 y 25; regiones variables de cadena pesada y ligera) y BMTK4-2 (también llamado Punto de referencia-2, BM-2 o BMTK-2) (SEQ ID NOs: 26 y 27; regiones variables de cadena pesada y ligera), cuyas secuencias de aminoácidos se derivaron de las secuencias de anticuerpos conocidos anti-CD38 daratumumab (también llamado HuMax-CD38, divulgado en la publicación internacional No. WO 06/099875) y SAR650984 (divulgado en la publicación internacional No. WO 08/047242), respectivamente. Palivizumab (SYNAGIS®) (MedImmune), un anticuerpo clínicamente aprobado que reconoce el virus sincitial respiratorio que sirvió como un control negativo para la unión de CD38.

50 Ejemplo 5: Detección de la unión de Ab79 por inmunofluorescencia

- 55 60 Se aplicó Ab79 marcado con colorante Alexa Fluor®-488 a secciones congeladas de tejido colorrectal humano normal, próstata y linfa. Palivizumab (Synagis®) marcado con colorante Alexa Fluor®-488 sirvió como un control de tinción negativo. Las imágenes inmunofluorescentes resultantes se muestran en la Figura 4. El patrón de tinción observado para Ab79 fue idéntico al observado con un anticuerpo políclonal anti-CD38 disponible comercialmente en tejido colorrectal humano normal, próstata y ganglio linfático (datos no mostrados).

También se aplicó Ab79 marcado con colorante Alexa Fluor®-488 a especímenes de médula ósea de mieloma normal y múltiple (Figura 5). Mientras que Ab79 se unía a ~ 10% de las células de médula ósea normal, 90% de las células de médula ósea de mieloma múltiple, en 4 de 4 muestras analizadas, mostraban unión de Ab79.

5 También se examinó la capacidad de Ab79 para unirse a varias líneas celulares (MOLP-8, Daudi, RPMI y MCF7). MOLP-8 (mieloma múltiple humano), Daudi (linfoblastos derivados de un paciente con linfoma de Burkitt), y células RPMI (línea celular establecida del paciente con leucemia mielógena crónica), todos mostraron unión a Ab79. La línea de cáncer de mama, MCF7, pareció en gran medida negativa para la unión de Ab79 (Figura 6).

10 Los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor®-488 se tiñeron en secciones congeladas con criostato de 8 µm, que se fijaron en una mezcla de etanol/acetona durante 5 min seguido de incubación con los anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara con humedad controlada. Las secciones se lavaron a continuación, se añadió un producto de montaje que contenía DAPI (Vector Laboratories, cat. # H1500), y se aplicó un cubreobjetos.

15 Ejemplo 6: Evaluación de la expresión de Ab79 en mieloma múltiple (MM) y leucemia linfocítica crónica (CLL)

Se analizó la unión de Ab79 a muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple mediante citometría de flujo después del enriquecimiento de las células CD138⁺ o mediante bloqueo en células CD138⁺CD45^{/lo} (Figura 7A). Se encontró que Ab79 se expresó en >95% de las células de cuatro de seis muestras de mieloma múltiple. El patrón de unión de Ab79 parecía en gran medida similar al de un anticuerpo anti-CD38 utilizado en laboratorios clínicos. Además, Ab79 se unió a células de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Figura 7B).

20 Para medir la unión de Ab79 a MM y CLL por FACS, las muestras de pacientes se procesaron en un lapso de 24 horas. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron por Ficoll-Paque^{MR} (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de expresión se realizó usando los siguientes paneles de anticuerpos con los clones entre paréntesis. Panel de MM: Ab79-Alexa Fluor®-488, CD45-PerCP (2D1), CD138-APC (MI15). Panel de CLL: Ab79-Alexa Fluor®-488; CD5-PE (UCHT2), CD45-PerCP (2D1), CD19-APC (SJ25C1). Se añadieron 5 µL de anticuerpo marcado con PE, PerCP o APC o 10 µL de anticuerpo marcado con Alexa Fluor®-488 o control de isotipo a cada pozo o tubo que contenía 100 µL de 0,2 x 10⁶ PBMC o células enriquecidas con CD138 de aspirado de médula ósea. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se lisaron los glóbulos rojos usando BD Pharmlyse, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se lavaron tres veces en regulador FACS. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 1% y se analizaron en BD FACSCanto^{MR} II o BD FACSCaliber^{MR}.

35 Ejemplo 7: Ensayos de CDC inducida por anti-CD38

Los clones de cynomolgus con reactividad cruzada se analizaron en cuanto a la capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las células MOLP-8 se sembraron en placa a una densidad de 10.000 células por pozo en una placa de cultivo de tejido negra de fondo plano de 96 pozos en 50 µL de medio completo (RPMI complementado con suero bovino fetal al 10%). Se añadieron 50 µL de anticuerpo 2x anti-CD38, anticuerpo IgG de control o medio solo a cada pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron cantidades variables (2-15 µL) de complemento de conejo purificado (cat. # CL 3441 Cedarlane Laboratories, Canadá), dependiendo de la línea celular, a cada pozo excepto los pozos de control. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se llevaron a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de reactivo de título celular CytoTox Glo^{MR} (Promega G7571/G7573) por pozo, la placa se agitó durante 5 a 7 min y se leyó la luminiscencia en un lector de placas de luminiscencia EnVision® (Perkin Elmer). Condiciones probadas: células solas; células + complemento; células + control de IgG + complemento; células + anticuerpo + complemento. El porcentaje de CDC se calculó usando la siguiente ecuación:

50
$$100 - (RLU_T/RLU_C) \times 100,$$

en la que RLU_T se refiere a las unidades de luminiscencia relativas de la muestra de prueba y RLU_C se refiere a las unidades de luminiscencia relativas de la muestra con complemento solo. El análisis estadístico se realizó con el software PRISM. Los valores de EC₅₀, determinados a partir de gráficas del % CDC frente a la concentración de anticuerpos, se muestran en la Tabla 1.

55 Ejemplo 8: Ensayos de ADCC inducidos por anti-CD38

60 Se evaluó la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) usando líneas celulares Daudi, MOLP-8 y RPMI-8226 como células objetivo. Las PBMC se aislaron como células efectoras mediante separación con Ficoll-Plaque^{MR} de la capa leucocitaria o LRS que se obtuvieron del Stanford Blood Center (Palo Alto, CA). Las muestras se diluyeron 1:3 con FBS al 2% en PBS. Se colocaron suavemente en capas 15 mL de Ficoll-Plaque^{MR} (GE Healthcare) bajo 35 mL de muestra diluida y se centrifugó a 1.800 rpm (freno desactivado) durante 25 minutos. La interfase turbia que contenía las PBMC se recogió, se lavó 3 veces en FBS al 2% en PBS y se congelaron alícuotas de 50 x 10⁶ células/mL por alícuota en DMSO/FBS al 10%. Las alícuotas congeladas de las PBMC se

descongelaron y se cultivaron durante la noche en FBS/RPMI al 10% + 5 ng/mL de IL2 humana recombinante (R & D Systems #202-IL) a razón de 2×10^6 por mL, cuando fue necesario.

Para el ensayo de ADCC, todas las etapas se realizaron en medio completo. Se sembraron en placa 5.000 células objetivo por pozo en una placa de 96 pozos en 50 μL de 3x anti-CD38, IgG de control, o se añadió medio solo seguido de 50 μL de PBMC humanas efectoras en una proporción de entre 1:25 a 1:50 de células objetivo:efectoras (T:E). Las placas se centrifugaron brevemente durante ~30 segundos a 800 rpm para acercar todas las células. Despues de 4 horas a 37°C, las placas se centrifugaron a 1.100 rpm durante 5 min y se transfirieron 100 μL de sobrenadante a una placa blanca. Se añadieron 100 μL de reactivo CytoTox Glo^{MR} (Promega cat. # G9292) al sobrenadante y las placas se dejaron bajo agitación durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó en un lector de placas de luminiscencia EnVision® (Perkin Elmer) y el porcentaje de lisis específica se calculó usando la siguiente ecuación:

$$(RLU_T/RLU_{E/T}) / (RLU_L/RLU_{E/T}) \times 100$$

en la que RLU_T se refiere a las unidades de luminiscencia relativas de la muestra de prueba y RLU_{E/T} se refiere a las unidades de luminiscencia relativas de la muestra que contiene células objetivo y células efectoras solamente, y RLU_L se refiere a las unidades de luminiscencia relativas para células lisadas con Triton X-100. El análisis estadístico se realizó con el software PRISM. Los valores de EC₅₀, determinados a partir de gráficas del % de lisis específica frente a la concentración de anticuerpo, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: CDC, ADCC, y actividad agonista para anticuerpos reformateados IgG

Anticuerpo	CDC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (DAUDI)	ADCC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (RPMI-8226)	Apoptosis EC50 nM (DAUDI)
BM-1	0,48 ± 0,16	0,03 ± 0,02	0,036 ± 0,013	0,13 ± 0,03	0,057
BM-2	0,65 ± 0,18	0,04 ± 0,02	0,024 ± 0,005	0,15 ± 0,04	0,062
Ab19	0,98 ± 0,26	0,08 ± 0,03	0,038 ± 0,008	0,46 ± 0,15	0,032
Ab43	2,2	0,12 ± 0,09	0,027 ± 0,018	3,84 ± 1,34	1,56
Ab72	0,66 ± 0,49	0,14 ± 0,12	0,193 ± 0,037	2,35 ± 0,99	0,35
Ab79	1,1 ± 0,39	0,03 ± 0,02	0,047 ± 0,012	0,46 ± 0,19	0,048
Ab110	1,99 ± 0,71	0,24 ± 0,17	0,874 ± 0,804	2,98 ± 0,91	0,40
Ab164	2,00 ± 0,83	ND	0,165 ± 0,154	1,2 ± 0,24	0,31

25 Ejemplo 9: Determinación de la afinidad por FACS

Se suspendieron células MOLP-8 que expresan CD38 en regulador de FBS al 1% a una concentración de células viables de aproximadamente 2 millones de células/mL. Los mAb a ensayar se diluyeron en serie (2 veces) a través de pozos sobre dos placas de 96 pozos en 1x PBS. El último pozo de cada titulación contenía solo regulador. Se añadieron PBS y suspensiones celulares adicionales a cada pozo, de modo que el volumen final fue de 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ y cada pozo contenía aproximadamente 100.000 células. Los mAb se enumeran a continuación con el intervalo de concentración de sitio de unión de mAb final correspondiente (concentración molecular 2X) utilizado para las valoraciones:

35 Punto de referencia 1, [mAb] sitio de unión = 50,8 nM - 49,7 pM

Punto de referencia 2, [mAb] sitio de unión = 49,5 nM - 48,3 pM

40 Ab 43, [mAb] sitio de unión = 49,3 nM - 48,2 pM

Ab 110, [mAb] sitio de unión = 204 nM - 49,9 pM

45 Ab 79, [mAb] sitio de unión = 103 nM - 25,3 pM

Ab 72, [mAb] sitio de unión = 103 nM - 25,2 pM

Ab 19, [mAb] sitio de unión = 100 nM - 12,2 pM •

50 Las placas se colocaron en un agitador de placas durante 5 horas a 4°C, despues de lo cual las placas se lavaron 3 veces a 4°C con 1 X PBS. A continuación, se añadieron 200 μL de anticuerpo polyclonal específico de Fc de IgG anti-humano Cy5 de cabra 99 nM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-175-008) a cada pozo, y las placas se agitaron durante 30 minutos a 4°C. Las placas se lavaron de nuevo 2x a 4°C con IX PBS, luego se usó un citómetro de flujo FACSCanto^{MR} II HTS para registrar la intensidad de fluorescencia media (MFI) de 5.000 eventos para cada pozo que contenía una concentración única de sitio de unión a mAb. Un gráfico de la intensidad de

fluorescencia media en función de la concentración del sitio de unión al anticuerpo se ajustó de forma no lineal con el software Scientist 3.0 usando la ecuación siguiente para estimar KD:

$$F = p[(KD + LT + n(M)) - \{(KD + LT + n(M))2 - 4n(M)(LT)\}1/2]/2 + B$$

en la que F (intensidad de fluorescencia media), LT (concentración del sitio de unión de mAb total), p (constante de proporcionalidad que relaciona unidades de fluorescencia arbitrarias con mAb unido), M (concentración celular en molaridad, 0,553 fM basado en 100.000 células en 300 μ L), n (número de receptores por celda), B (señal de fondo) y KD = constante de disociación de equilibrio.

Para cada curva de titulación de anticuerpos, se obtuvo una estimación para KD cuando P, n, B y KD flotaban libremente en el análisis no lineal. Para una derivación detallada de la ecuación anterior, véase Drake y Klakamp (2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants", J. Immunol. Methods 318: 157-62, que se incorpora aquí como referencia. La Tabla 3 enumera las KD resultantes para todos los anticuerpos en orden de afinidad decreciente junto con el intervalo de confianza del 95 % de cada ajuste entre paréntesis. La concentración del sitio de unión del anticuerpo (2 veces la concentración molecular) se usó para el ajuste de la curva no lineal.

Ejemplo 10: Determinación de afinidad por Biacore®

La afinidad de los anticuerpos IgG con el ectodominio de CD38 soluble (ECD) se determinó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un Biacore^{MR} A100 a 22°C. El anticuerpo polyclonal de IgG antihumana de cabra (Caltag H10500) se inmovilizó en un chip biosensor CM5 usando un acoplamiento de amina estándar a los puntos 1, 2, 4 y 5 dentro de las cuatro celdas de flujo del chip. Los niveles de inmovilización en cada punto oscilaron entre 5865 RU y 6899 RU. La CD38 humana se obtuvo de R & D Systems (Cat. # 2404-AC, lote # PEH020812A). La concentración patrón para CD38 se determinó usando métodos detallados en Pace et al. (1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" Protein Science 4(11):2411-23 y Pace y Grimsley (2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration" en Current Protocols in Protein Science, Capítulo 3: Unidad 3.1, la enseñanza de cada referencia se incorpora aquí como referencia.

Se preparó regulador de operación desgasificando solución salina regulada con HEPES, polisorbato 20 al 0,005% y añadiendo BSA filtrado hasta una concentración final de 100 μ g/mL. Los ocho mAb purificados se diluyeron hasta aproximadamente 2 μ g/mL con regulador de operación. Los experimentos preliminares estimaron la cantidad de cada mAb que se debe capturar para mantener una capacidad superficial ($R_{máx}$) no superior a ~ 100 RU. Para cada ciclo de captura de mAb/inyección de antígeno, se capturó un mAb sobre los puntos 1 y 5 dentro de cada celda de flujo con los puntos 2 y 4 yuxtapuestos como las superficies de referencia respectivas. Cada mAb diluido se capturó durante 1 minuto a una velocidad de flujo de 10 μ L/min seguido de tres minutos de flujo del regulador de operación para la estabilización de la superficie. Se inyectó HuCD38 sobre las cuatro celdas de flujo durante 120 segundos a razón de 30 μ L/min en un intervalo de concentración de 193,7 nM - 3,0 nM (dilución en serie 2x) seguido de una fase de disociación de 15 minutos. Las muestras se prepararon todas en el regulador de operación y luego se inyectaron aleatoriamente por triplicado con siete inyecciones de regulador intercaladas para referenciación doble. Las superficies se regeneraron con dos pulsos de 20 segundos de glicina 10 mM, pH 1,7.

Todos los datos del sensograma se procesaron con el software Scrubber 2.0c y se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 en Scrubber 2.0c. Las constantes de unión resultantes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo	FACS KD (nM) MOLP-8	FACS KD (pM) RPMI-8226	Biacore Ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Biacore Kd (s^{-1})	Biacore KD (nM)
BM-1	1,1 (0,9)	802	$4,49 \times 10^4$	$2,46 \times 10^{-3}$	54,8
BM-2	1,6 (0,6)	428	$4,24 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-3}$	5,4
Ab19	0,4 (0,3)	-	$1,54 \times 10^5$	$8,10 \times 10^{-4}$	5,3
Ab79	1,2 (1,1)	508	$1,22 \times 10^5$	$6,75 \times 10^{-4}$	5,5
Ab72	0,6 (0,4)	-	$1,44 \times 10^4$	$1,82 \times 10^{-3}$	126
Ab110	1,0 (0,1)	-	$1,22 \times 10^5$	$1,71 \times 10^{-1}$	1400
Ab43	1,1 (0,3)	-	$2,72 \times 10^5$	$1,46 \times 10^{-1}$	537
Ab164	1,4 (0,7)	-	$1,99 \times 10^5$	$7,15 \times 10^{-2}$	359

Ejemplo 11: Ensayos de internalización de inmunofluorescencia

Se usaron técnicas de inmunofluorescencia para evaluar la internalización de anticuerpos anti-CD38 en células MOLP-8. Se recogieron células MOLP-8 y se tiñeron 5×10^6 células durante 10 min a 4°C en RPMI-1640 con 1 μ g de cada anticuerpo anti-CD38 directamente conjugado con Alexa Fluor® 488. Las células se lavaron en PBS que contenía BSA al 1% y se incubaron 1×10^6 células durante 3 o 6 horas a 4°C o 37°C. La tinción superficial se

inactivó durante 30 min a 4°C usando 2 µg de anticuerpo anti-Alexa Fluor®-488 de conejo (Invitrogen). Las células se lavaron y se fijaron en PBS con PFA al 1%, se transfirieron a una placa Microtest de 96 pozos (BD Biosciences) y se evaluaron mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACSCanto® II (BD Biosciences) o se obtuvieron imágenes usando ImageXpress® Micro (Molecular Devices) a 20 aumentos.

- 5 Ejemplo 12: Agrupamiento de epítopos por Biacore®
- 10 Se utilizó la instrumentación Biacore® A100 para agrupar los dos anticuerpos de referencia, así como Ab19 y Ab79. Los anticuerpos se inmovilizaron primero a altas y bajas densidades en un chip CM5 usando la química de acoplamiento NHS/EDC. Para cada ciclo del experimento de agrupamiento de epítopos, se inyectó primero CD38 sobre estas superficies. De manera análoga a un ensayo en sándwich en formato de ELISA, se inyectó entonces un anticuerpo único (tomado del conjunto de anticuerpos inmovilizados) sobre superficies que contenían complejos CD38/anticuerpo. Las superficies se regeneraron utilizando pulsos de ácido fosfórico al final de cada ciclo. Los datos se recogieron a 22°C usando HBS-P (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,005% P-20) complementado con BSA. Los sensogramas resultantes se procesaron utilizando el módulo "Mapeo de Epítopos" en el paquete de software de evaluación Biacore® A100, así como una versión de prueba de Scrubber para los conjuntos de datos A100. Los datos replicados se usaron para generar una matriz binaria de 4 x 4 para los 4 mAb anteriores a partir de dos experimentos separados, como se muestra en la Tabla 3.

20

Tabla 3

	Ab79	BM1	Ab19	BM2
Ab79	0	0	1	1
BM1	0	0	1	0
Ab19	1	1	0	0
BM2	1	0	0	

Ejemplo 13: Análisis *in vivo*

- 25 La eficacia *in vivo* de Ab19 y Ab79 se probó en un modelo Daudi-luciferasa diseminado de linfoma humano. Se inyectaron por vía intravenosa ratones hembra CB.17 SCID de 6-8 semanas de Taconic Laboratories con 1×10^6 células tumorales Daudi-Luc. En el día 7 del estudio, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con: palivizumab, Ab 79, Ab19, Punto de referencia 1 y Punto de referencia 2. Se realizaron imágenes bioluminiscentes semanalmente a partir del día 21 usando un sistema IVIS Xenogen (Caliper Life Sciences) para controlar la carga tumoral. Para la formación de imágenes, a los animales se les inyectó por vía IP con sustrato de luciferasa (150 mg/kg) 10 minutos antes de la formación de las imágenes, luego los animales se anestesiaron bajo isofluorano y se tomaron las imágenes. Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

Listado de secuencias

35 SEQ ID NO: 1 (CD38 *Homo sapiens*; NP_001766.2)

```
MANCEFSPVSGDKPCCRSLRRAQLCLGVSLVLILVVVLA  
VVVPRWRQQW  
PGTTKRFPETVLR  
LARCVKYTEIHPEMRHVDCQS  
VWDAFKGAFISKHPCNITEED  
YQPLMKG  
LTQVPCNKILLWSRIKDLA  
HQFTQVQRDMFTLED  
TLLGYLADDL  
TWC  
GEFNTSKINYQSCP  
DW  
RKDCSN  
NPVS  
VF  
WKT  
V  
SRR  
FAEA  
ACDV  
VH  
VMLNG  
RSK  
IF  
DKN  
STFG  
SVE  
VHN  
LQPE  
KV  
QALE  
AW  
VIHG  
GRE  
DSR  
DLC  
QD  
PTIKE  
LEIIS  
KRNI  
QFS  
CKNI  
YRP  
DKFL  
QC  
VK  
NP  
EDSS  
CTSEI
```

40 SEQ ID NO: 2 (CD38 *Macaca fascicularis*; AAT36330.1)

```
MANCEFSPVSGDKPCCRSLRRAQVCLGV  
CLLVLLILVV  
VVVAVV  
VLP  
WRQQW  
SGSGTTS  
RF  
PETV  
LAR  
CV  
KY  
TE  
V  
HPE  
MR  
HV  
DC  
QS  
V  
W  
DA  
F  
K  
G  
A  
F  
I  
S  
K  
Y  
P  
C  
N  
I  
T  
E  
D  
Y  
Q  
P  
L  
V  
K  
L  
G  
T  
Q  
T  
V  
P  
C  
N  
K  
T  
L  
L  
W  
S  
R  
I  
K  
D  
L  
A  
H  
Q  
F  
T  
Q  
V  
Q  
R  
D  
M  
F  
T  
L  
E  
D  
M  
L  
L  
G  
Y  
L  
A  
D  
L  
T  
W  
C  
G  
E  
F  
N  
T  
F  
E  
I  
N  
Y  
Q  
S  
C  
P  
D  
W  
R  
K  
D  
C  
S  
N  
N  
P  
V  
S  
F  
W  
K  
T  
V  
S  
R  
R  
F  
A  
E  
T  
A  
C  
G  
V  
V  
H  
V  
M  
L  
N  
G  
R  
S  
R  
K  
I  
F  
D  
K  
N  
S  
T  
F  
G  
S  
V  
E  
V  
H  
N  
L  
Q  
P  
E  
K  
V  
Q  
A  
L  
E  
A  
W  
V  
I  
H  
G  
G  
R  
E  
D  
S  
R  
D  
L  
C  
Q  
D  
P  
T  
I  
K  
E  
L  
E  
I  
I  
S  
K  
R  
N  
I  
R  
F  
F  
C  
K  
N  
I  
Y  
R  
P  
D  
K  
F  
L  
Q  
C  
V  
K  
N  
P  
E  
D  
S  
S  
C  
L  
S  
G  
I
```

SEQ ID NO: 3 (HCDR1 Ab79)

45 GFTFDDYG

SEQ ID NO: 4 (HCDR2 Ab79)

ISWNGGKT

SEQ ID NO: 5 (HCDR3 Ab79)

5 ARGSLFHDSSGFYFGH

SEQ ID NO: 6 (LCDR1 Ab79)

10 SSNIGDNY

SEQ ID NO: 7 (LCDR2 Ab79)

RDS

15 SEQ ID NO: 8 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLGS

SEQ ID NO: 9 (Cadena pesada Ab79)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDI
SWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLF
HDSSGFYFGHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:10 (Cadena ligera Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKLT
25 VLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

SEQ ID NO:11 (Cadena pesada Ab19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAI
SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA

30 SEQ ID NO:12 (Cadena ligera Ab19)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTK
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

35 SEQ ID NO: 13 (HCDR1 Ab19)

GFTFNNYG

SEQ ID NO: 14 (HCDR2 Ab19)

40 ISYDGSDK

SEQ ID NO: 15 (HCDR3 Ab19)

45 ARVYYYGFSGPSMDV

SEQ ID NO: 16 (LCDR1 Ab19)

50 NSNIGSNT

SEQ ID NO: 17 (LCDR2 Ab19)

SDS

55 SEQ ID NO: 18 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLGSR

SEQ ID NO: 19 (Cadena pesada Ab19) con/constante

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
 SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
 GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDY
 FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO: 20 (Cadena ligera Ab19) conconstante

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
 RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTK
 LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
 VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTV
 APTECS

10

SEQ ID NO: 21 (Cadena pesada Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWSVRQAPGKGLEWVSDI
 SWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLF
 HDSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKD
 YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

SEQ ID NO: 22 (Cadena ligera Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
 RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLT
 VLQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
 AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS

SEQ ID NO: 23 (CD157 Homo sapiens; NP_004325)

20

MAAQGCAASRLQLLQLLLLLLAAAGGARARWRGEGETSAHLRDIFLGRC
 AEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSPRD
 KSLFWENSHELLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGSLDYQ
 SCPTS
 EDCENNPDWSFWKRASIQYSKDSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPN
 LQKEKITRIEWVMHEIGGPNVESCGEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRP
 VKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSPLYTEQRAGLIPLFLVLASRTQL

25

SEQ ID NO: 24 (Punto de referencia 1; región variable de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
 GSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWF
 GEPVFDYWQGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 25 (Punto de referencia 1; región variable de cadena ligera)

30

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN
 RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
 R

ES 2 674 175 T3

SEQ ID NO: 26 (Punto de referencia 2; región variable de cadena pesada)

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTI
YPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHSSLASEDSAVYYCARGDY
YGSNSLDYWGGQGTSVTVSS

5 SEQ ID NO: 27 (Punto de referencia 2; región variable de cadena ligera)

DIVMTQS HLSMSTS L GDPVSITCKAS QDVSTVVAWYQQKPGQSPRRIYSASY
RYIGVPDRFTGSGAGTDFTI SSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGTKLEI
KR

SEQ ID NO: 28 (Cadena pesada Ab43)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSRI
NSDGSSTSYADSMKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGY
YYAMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVG DVEVHN AKTPREEQYNSTYRVV SVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 29 (Cadena ligera Ab43)

15 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSNIGYKTVN WYQQLPGTAPKLLIYDNN
KRPSGVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGLVFGGGT
KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTV A WKADGS
PVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS

SEQ ID NO: 30 (Cadena pesada Ab72)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNW VRQAPGKGLEW VSGIS
GSGG STYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KDSNYD
FWSGYYYGMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLV
KD YFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLM
ISRTPEVTVV DVSHEDPEVKFNWYVG DVEVHN AKTPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (Cadena ligera Ab72)

25 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSNIGS KTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNN
RPSGVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYARSTNIIFGGGT KLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTV A WKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAP
TECS

SEQ ID NO: 32 (Cadena pesada Ab110)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VSIY
SGG STYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWGG
ATHDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV
CVVV DVSHEDPEVKFNWYVG DVEVHN AKTPREEQYNSTYRVV SVLTVL
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

SEQ ID NO: 33 (Cadena ligera Ab110)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQ
 RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGVLFGGGTK
 LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
 VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTV
 APTECS

5

SEQ ID NO: 34 (Cadena pesada Ab19) con/constante

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWRQAPGKGLEWVAI
 SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
 GFSGPSMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSSSVTVPSSSLGTQTYICNV

NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

10

SEQ ID NO: 35 (Cadena ligera Ab19) con/constante

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
 RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTK
 LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
 VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTV
 APTECS

15

Listado de secuencias

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited Elias, Kathleen A. Landes, Gregory Singh, Shweta Korver, Wouter Drake, Andrew W. Haak-Frendscho, Mary Snell, Gyorgy P. Bhaskar, vinay

20

<120> Anticuerpos anti-CD38 conjugados

<130> 101588-5008-WO

25

<140> Solicitud de patente PCT No. para ser asignada

<141> 2011-12-30

<150> 61/428.699

30

<151> 2010-12-30

<150> 61/470.382

<151> 2011-03-31

35

<150> 61/470.406

<151> 2011-03-31

<150> 61/485.104

<151> 2011-05-11

40

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

45

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 674 175 T3

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
195 200 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
245 250 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
260 265 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
275 280 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
290 295 300

<210> 2

<211> 301

5 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 2

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr
 180 185 190

Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val His Val Met
 195 200 205

Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly
 210 215 220

Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Ala Leu Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln
 245 250 255

Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile
 260 265 270

Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys
 275 280 285

Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile
 290 295 300

<210> 3

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<<220>>

<<223>> CDR1 de cadena pesada de Ab79

ES 2 674 175 T3

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

5 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR2 de cadena pesada de Ab79

<400> 4

Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr
1 5

15 <210> 5
<211> 16
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada de Ab79

25 <400> 5

Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
1 5 10 15

30 <210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR1 de cadena ligera de Ab79

<400> 6

Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr
1 5

40 <210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR2 de cadena ligera de Ab79

<400> 7

Arg Asp Ser
1

50 <210> 8
<211> 10
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena ligera de Ab79

60

ES 2 674 175 T3

<400> 8

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser
1 5 10

5 <210> 9
<211> 135
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Región variable de cadena pesada de Ab79

<400> 9

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

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

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

Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

15 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135

<210> 10
<211> 129
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de Ab79

25 <400> 10

ES 2 674 175 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu

<210> 11

<211> 134

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ab19

10

<400> 11

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

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

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

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

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

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

ES 2 674 175 T3

	85	90	95	
	Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp			
	100	105	110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
	115	120	125	
	Ser Val Phe Pro Leu Ala			
	130			
5	<210> 12			
	<211> 130			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
10	<220>			
	<223> Cadena ligera de Ab19			
	<400> 12			
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
	1	5	10	15
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
	20	25	30	
	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
	35	40	45	
	Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
	50	55	60	
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
	65	70	75	80
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu			
	85	90	95	
	Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
	100	105	110	
	Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
	115	120	125	
	Glu Leu			
	130			
15	<210> 13			
	<211> 8			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
20	<220>			
	<223> CDR1 de cadena pesada de Ab19			
	<400> 13			
25	Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly			
	1	5		

5 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de Ab19
 <400> 14
 15 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys
 1 5
 <210> 15
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de Ab19
 20 <400> 15
 25 Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de Ab19
 <400> 16
 35 Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de Ab19
 45 <400> 17
 50 Ser Asp Ser
 1
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de Ab19
 <400> 18
 60 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Arg
 1 5 10

ES 2 674 175 T3

<210> 19
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada de Ab19

10 <400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

ES 2 674 175 T3

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 20

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Ab19

ES 2 674 175 T3

<400> 20

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

5 <210> 21
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena pesada de Ab79

<400> 21

ES 2 674 175 T3

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

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

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

Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

ES 2 674 175 T3

245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
360	365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
375	380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
425	430	
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
440	445	
Lys		

<210> 22

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Ab79

10

<400>

1 5 10 15

ES 2 674 175 T3

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 23

<211> 318

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ala Gln Gly Cys Ala Ala Ser Arg Leu Leu Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ala Arg Ala
 20 25 30

ES 2 674 175 T3

Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg Asp Ile Phe Leu
 35 40 45

Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro Glu Gln Arg Asn
 50 55 60

Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val Ala Leu Asp Lys
 65 70 75 80

Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu Phe Ile Asn Leu
 85 90 95

Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe Trp Glu Asn Ser
 100 105 110

His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro
 115 120 125

Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys
 130 135 140

Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser
 165 170 175

Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn
 180 185 190

Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp
 195 200 205

Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile
 210 215 220

Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu
 225 230 235 240

Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln
 245 250 255

Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val
 260 265 270

Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala
 275 280 285

Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu
 290 295 300

Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu
 305 310 315

ES 2 674 175 T3

<210> 24
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada del Punto de referencia 1

10 <400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del Punto de referencia 1

20

<400> 25

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

<210> 26

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del Punto de referencia 2

10

<400> 26

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110 115

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cadena ligera del Punto de referencia 2

<400> 27

ES 2 674 175 T3

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ab43

10 <400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 29

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Ab43

10 <400> 29

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Lys
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

ES 2 674 175 T3

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 30

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ab72

10

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ser Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430 435

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

ES 2 674 175 T3

<210> 31
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera de Ab72

<400> 31

10

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
1					5									15	
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Lys															
					20									30	
Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu															
					35									45	
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser															
					50									60	
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg															
					65									80	
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Ala Arg Ser															
					85									95	
Thr Asn Ile Ile Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln															
					100									110	
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu															
					115									125	
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr															
					130									140	
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys															
					145									160	
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr															
					165									175	
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His															
					180									190	
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys															
					195									205	
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser															
					210									215	

15

<210> 32
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

ES 2 674 175 T3

<220>

<223> Cadena pesada de Ab110

<400> 32

5

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Ala Thr Trp Gly Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 674 175 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 33

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Ab110

10 <400> 33

ES 2 674 175 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 34

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ab119

10 <400> 34

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 674 175 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 35
<211> 217
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ab19

10 <400> 35

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

ES 2 674 175 T3

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y a CD38 de cynomolgus (SEQ ID NO: 2) que comprende:
 - 5 a) una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9;
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 10; y
 - 10 c) un residuo de fármaco unido covalentemente.
2. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 22.
- 15 3. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además un dominio Fc.
4. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho dominio Fc es un dominio Fc humano o una variante.
- 20 5. Un anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho residuo de fármaco está unido a dicho anticuerpo usando un enlazador.
- 25 6. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho residuo de fármaco se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un maitansinoide y caliqueamicina, una dolstatina y un tricoteceno.
7. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la reivindicación 1 y un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la reivindicación 1.
- 30 8. Un método para producir el anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 bajo las condiciones en las que se produce dicho anticuerpo.
9. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 35 10. Un anticuerpo aislado para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicho cáncer es cáncer hematológico y se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células plasmáticas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma de células B y linfoma de Burkitt.
- 40 11. Un anticuerpo aislado para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho cáncer hematológico es mieloma múltiple.
12. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento.

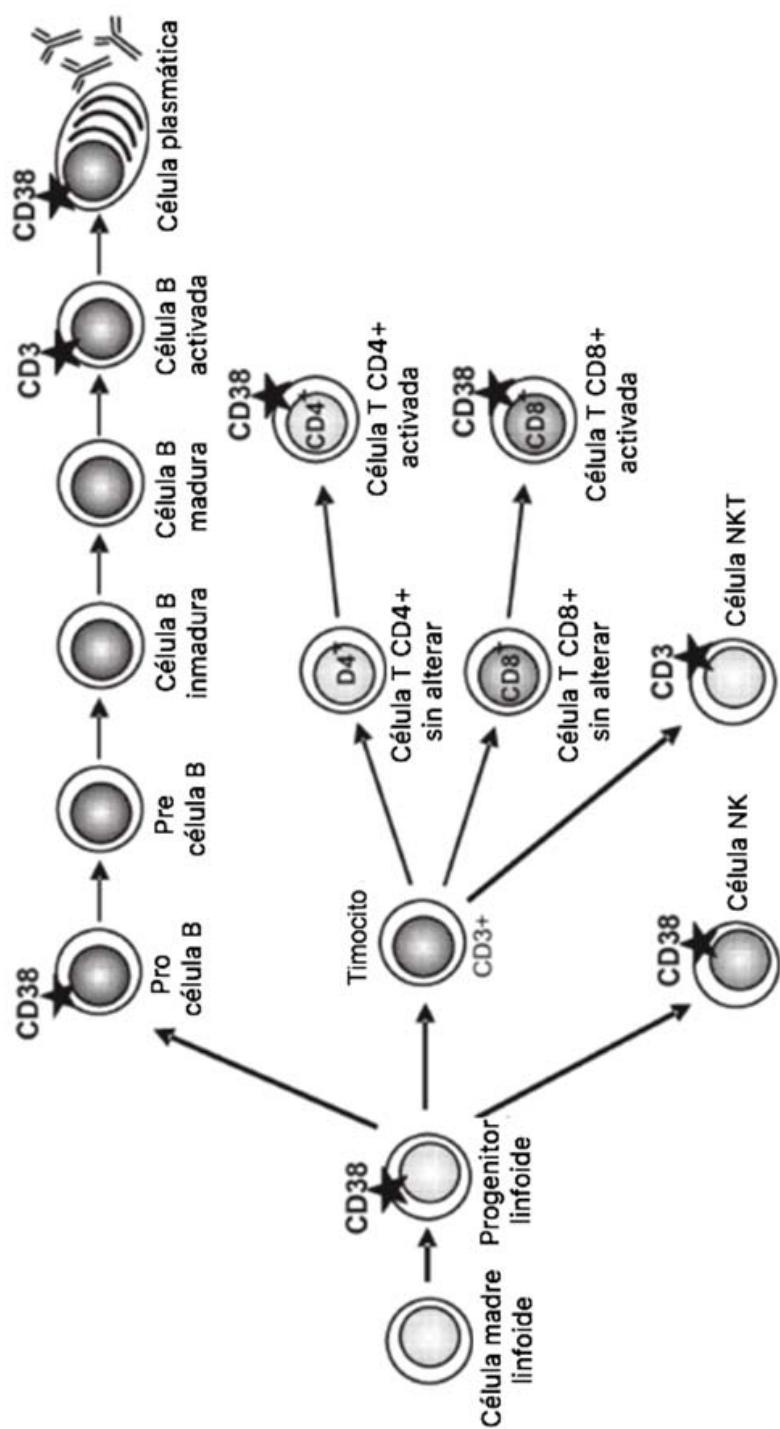
FIGURA 1

FIGURA 2

Cadena Pesada de Ab79 (SEQ ID NO: 21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMswVRQAPGKGLEWVSDIS
WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH
DSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVVDVSHEDEPKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Ligera de Ab79 (SEQ ID NO: 22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGDNVVWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

Cadena Pesada de Ab19 (SEQ ID NO: 11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMswVRQAPGKGLEWVAI
SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVVDVSHEDEPKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Ligera de Ab19 (SEQ ID NO: 12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKL
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PTECS

FIGURA 3

CD38 *Homo sapiens* (Acceso NP_001766.2; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQCLCLGVSLVLILVVVLAVVVPRWRQQWSPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKGQT
VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLWC GefNTSKINYQSCP
DWRKDCSNPVSFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNQ
PEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLQDPTIKELESIISKRNQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPE
DSSCTSEI

CD38 *Macaca fascicularis/Cynomolgus/* macaco comedor de cangrejo (Acceso AAT36330.1; SEQ ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVAVVLPWRQQWSPGTTTS
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGQT
TVPCNKTLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLWC GefNTFEINYQSC
PDWRKDCSNPVSFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHN
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN
PEDSSCLSGI

FIGURA 4

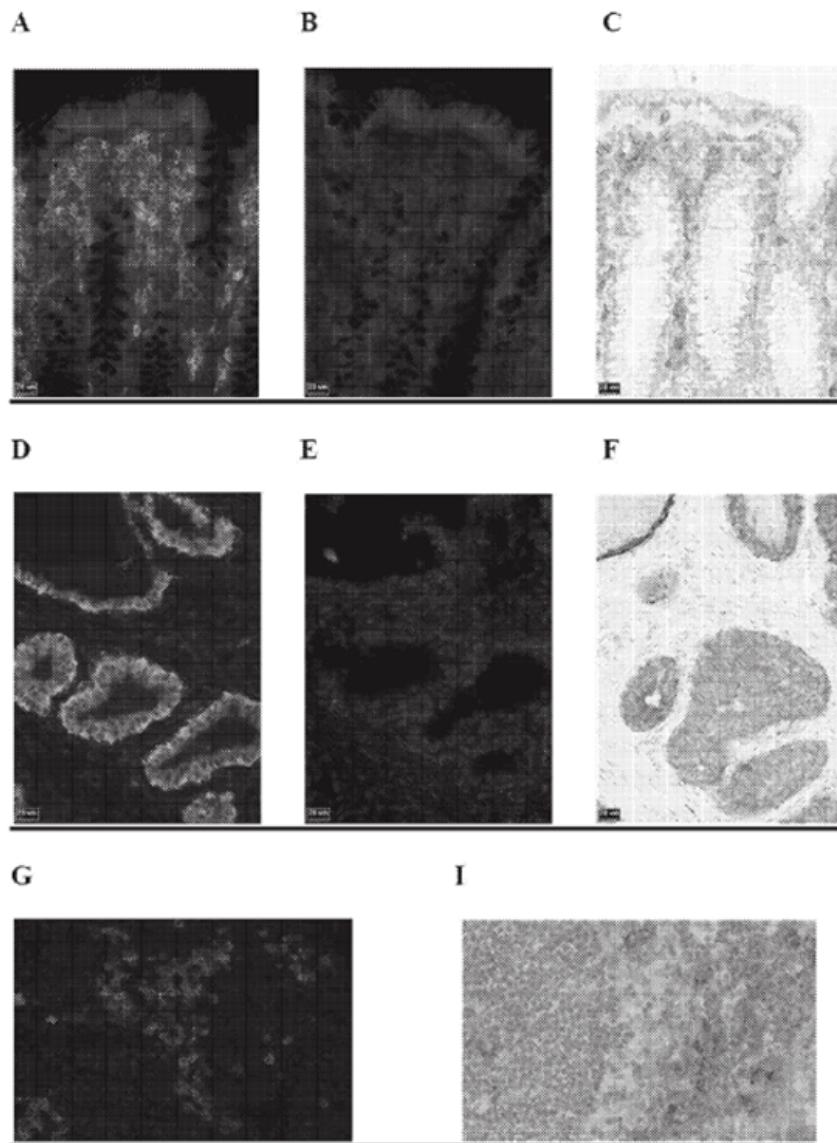
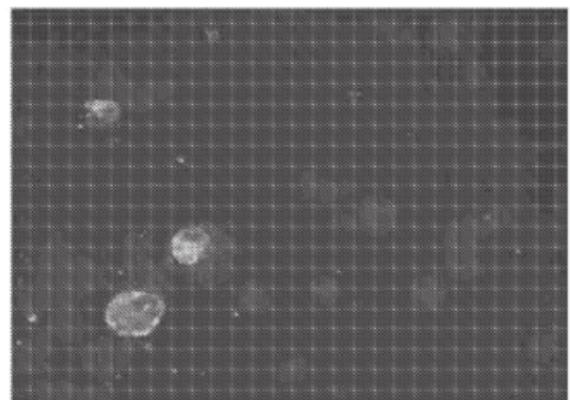


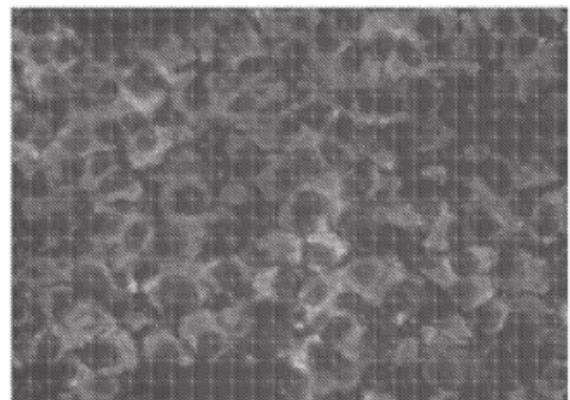
FIGURA 5

A



40X

B



40X

FIGURA 6

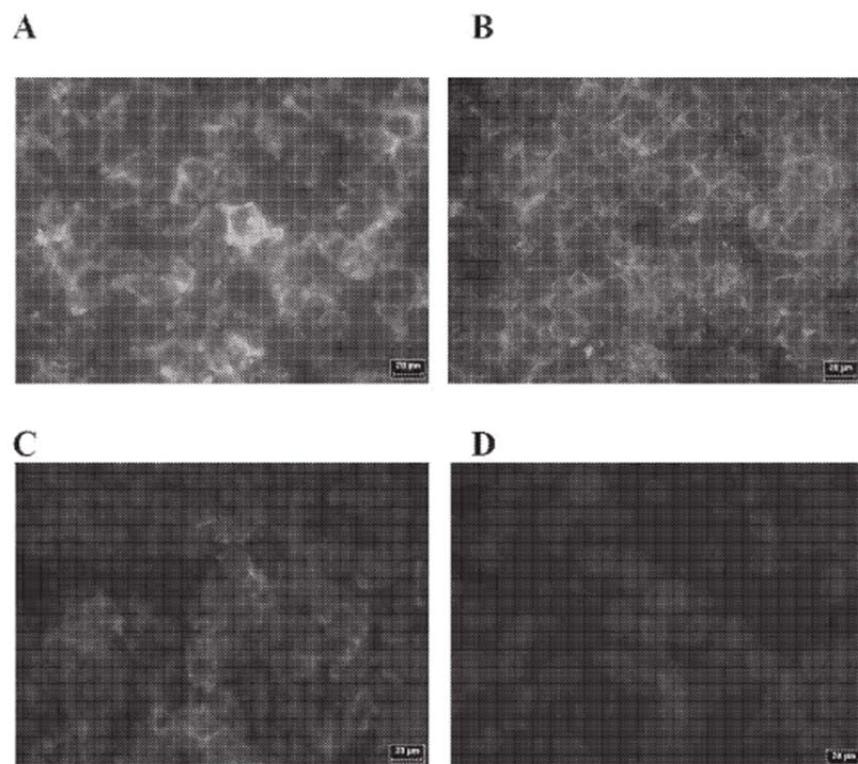


FIGURA 7

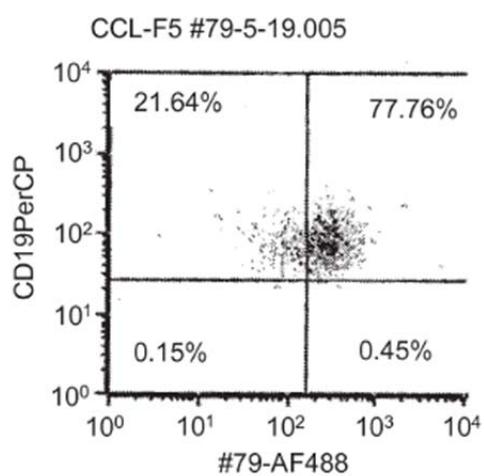
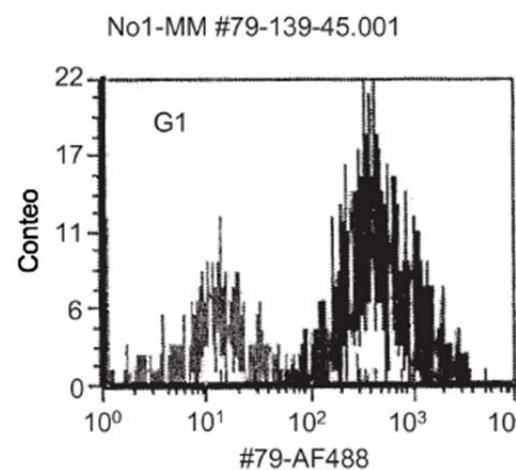


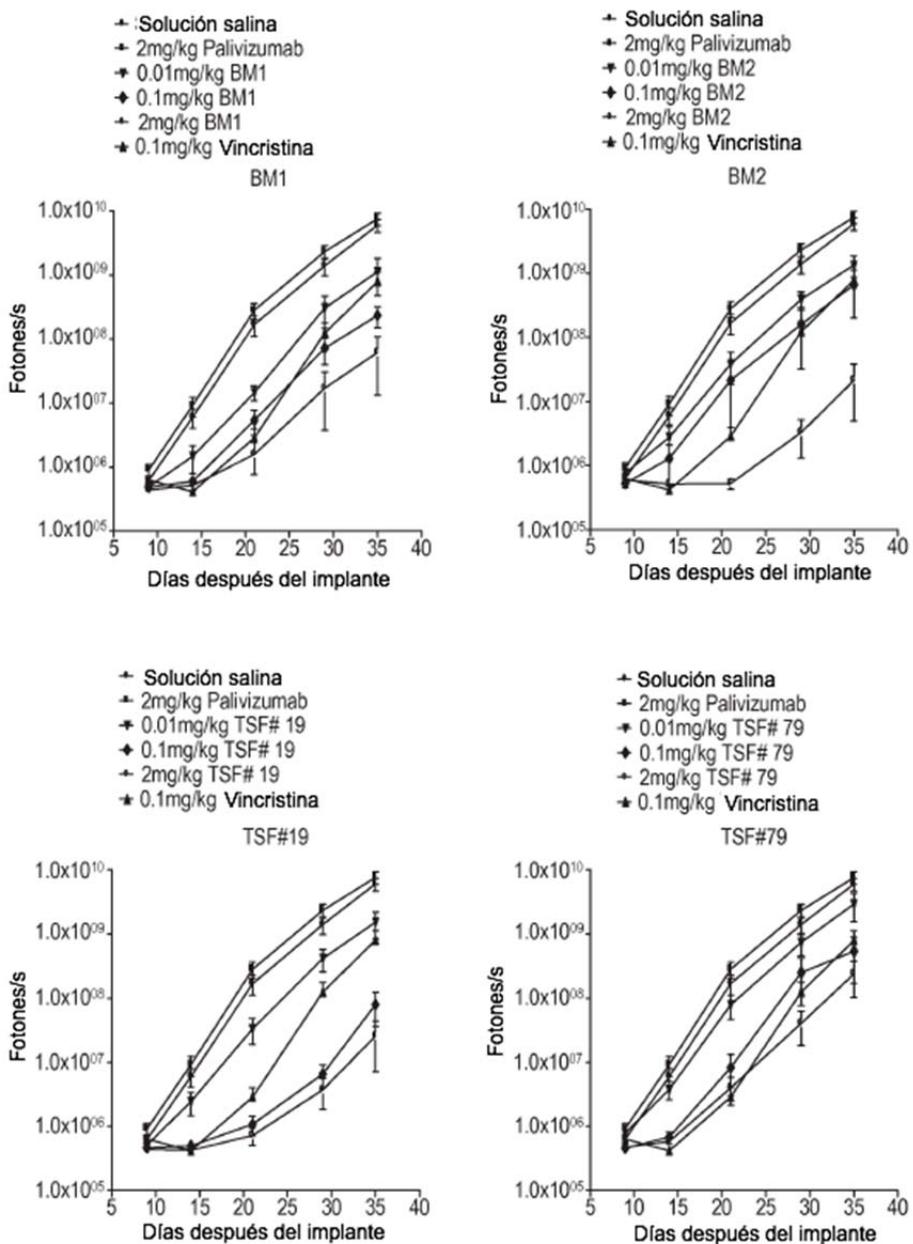
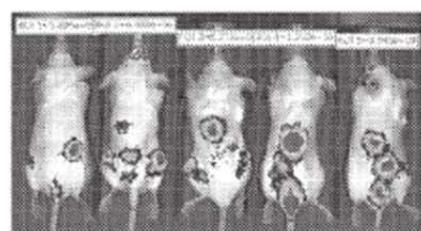
FIGURA 8

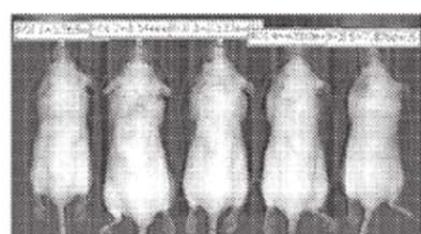
FIGURA 9



Solución salina



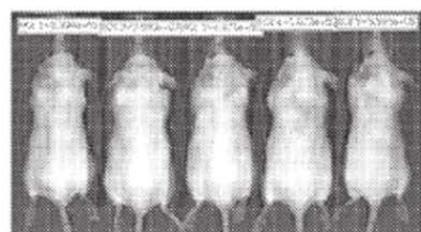
2mg/kg Palivizumab



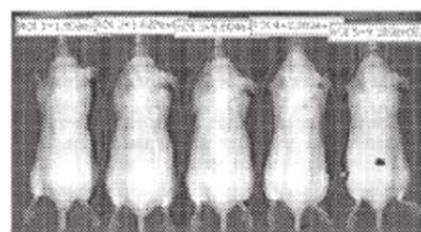
0.1 mg/kg BM1



0.1 mg/kg BM2



0.1 mg/kg TSF #19



0.1 mg/kg TSF #79

FIGURA 10

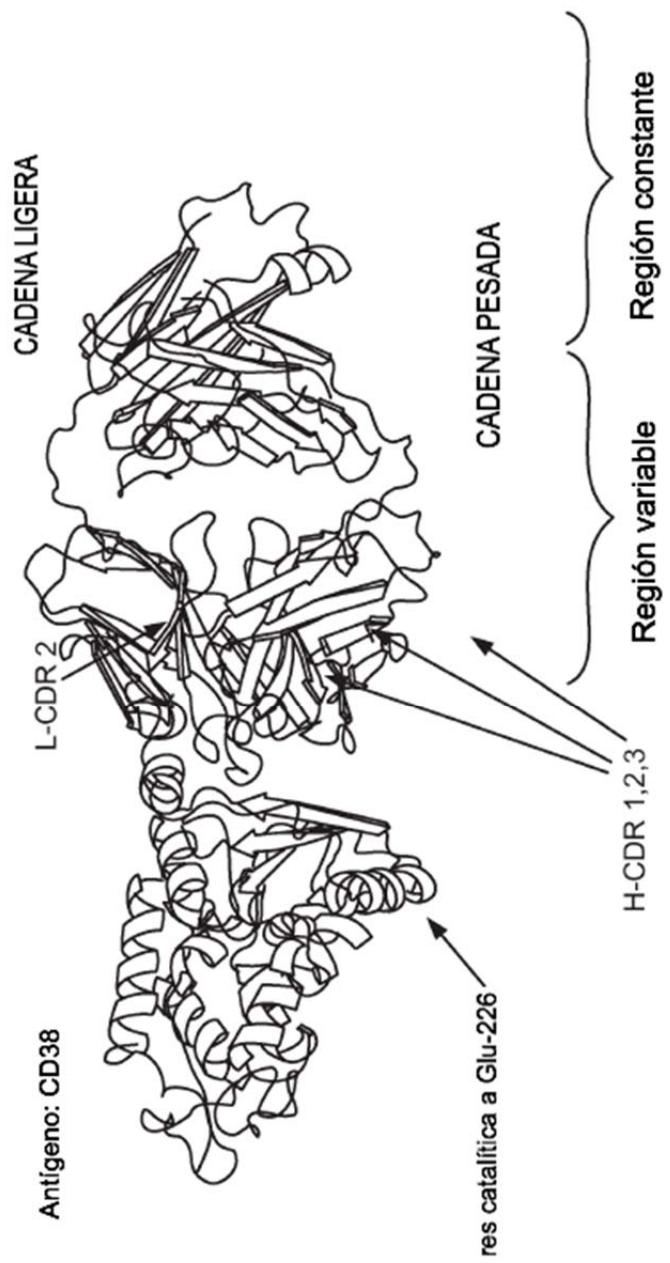


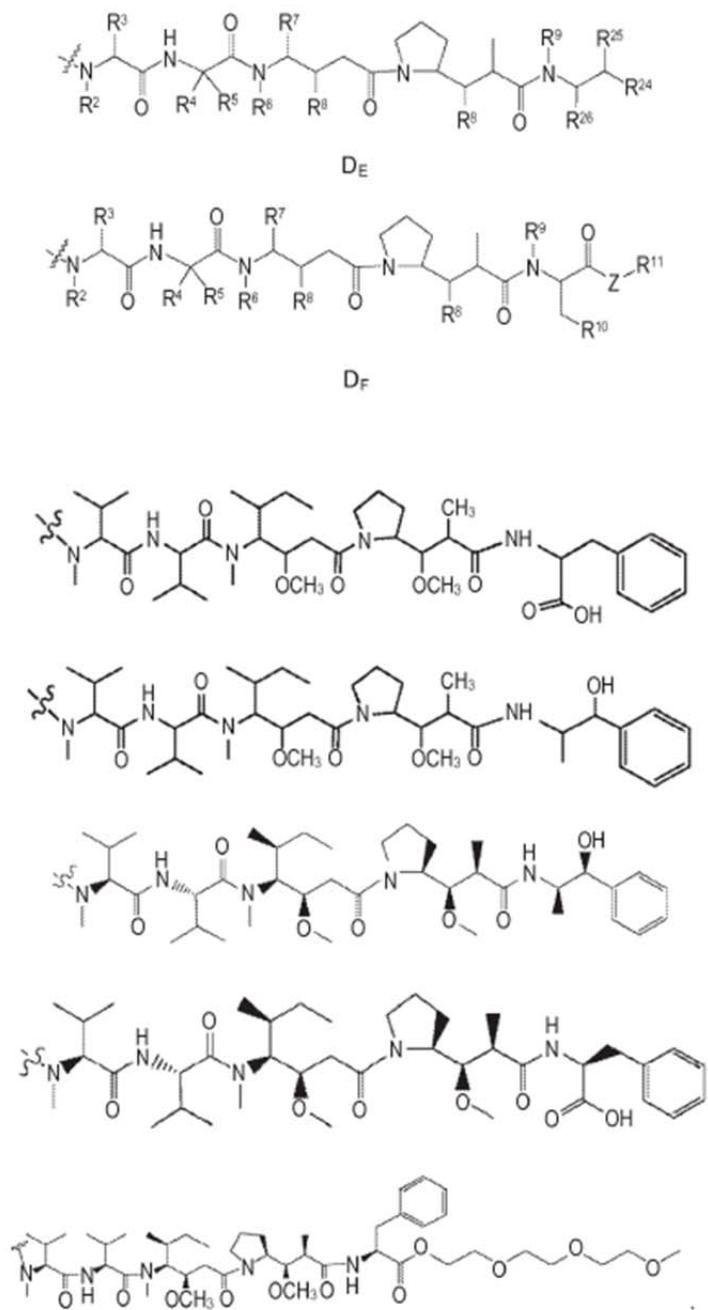
FIGURA 11

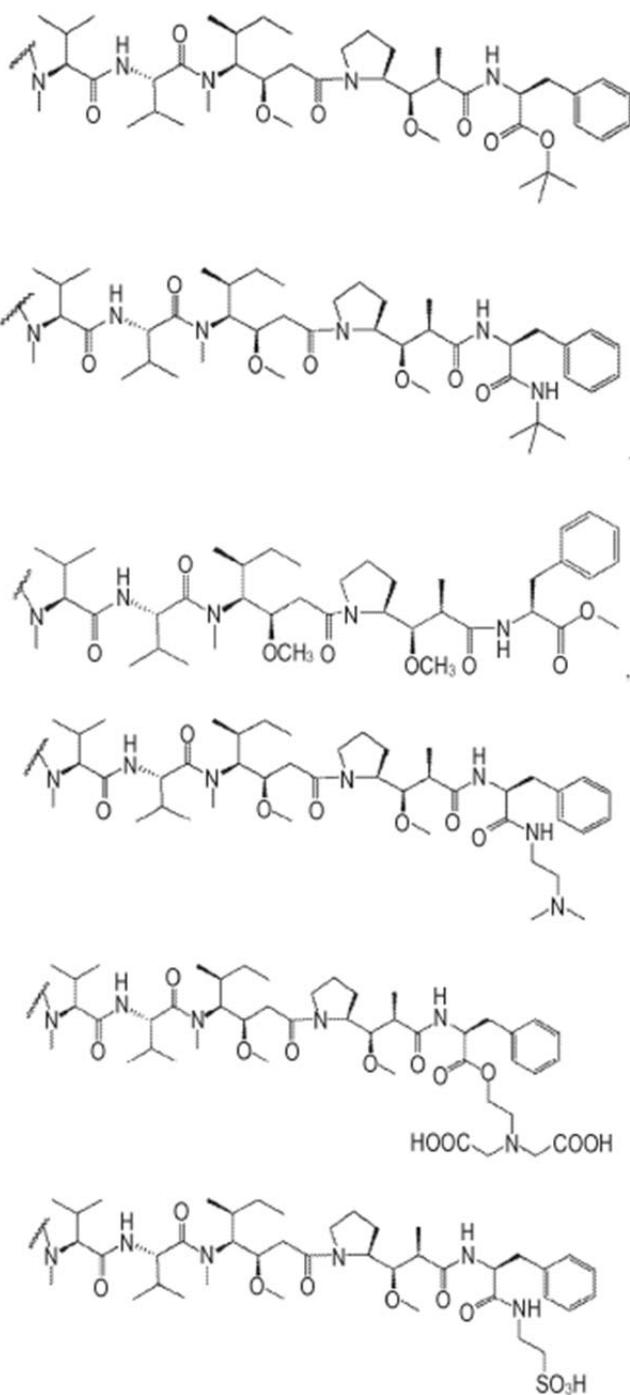
FIGURA 11A

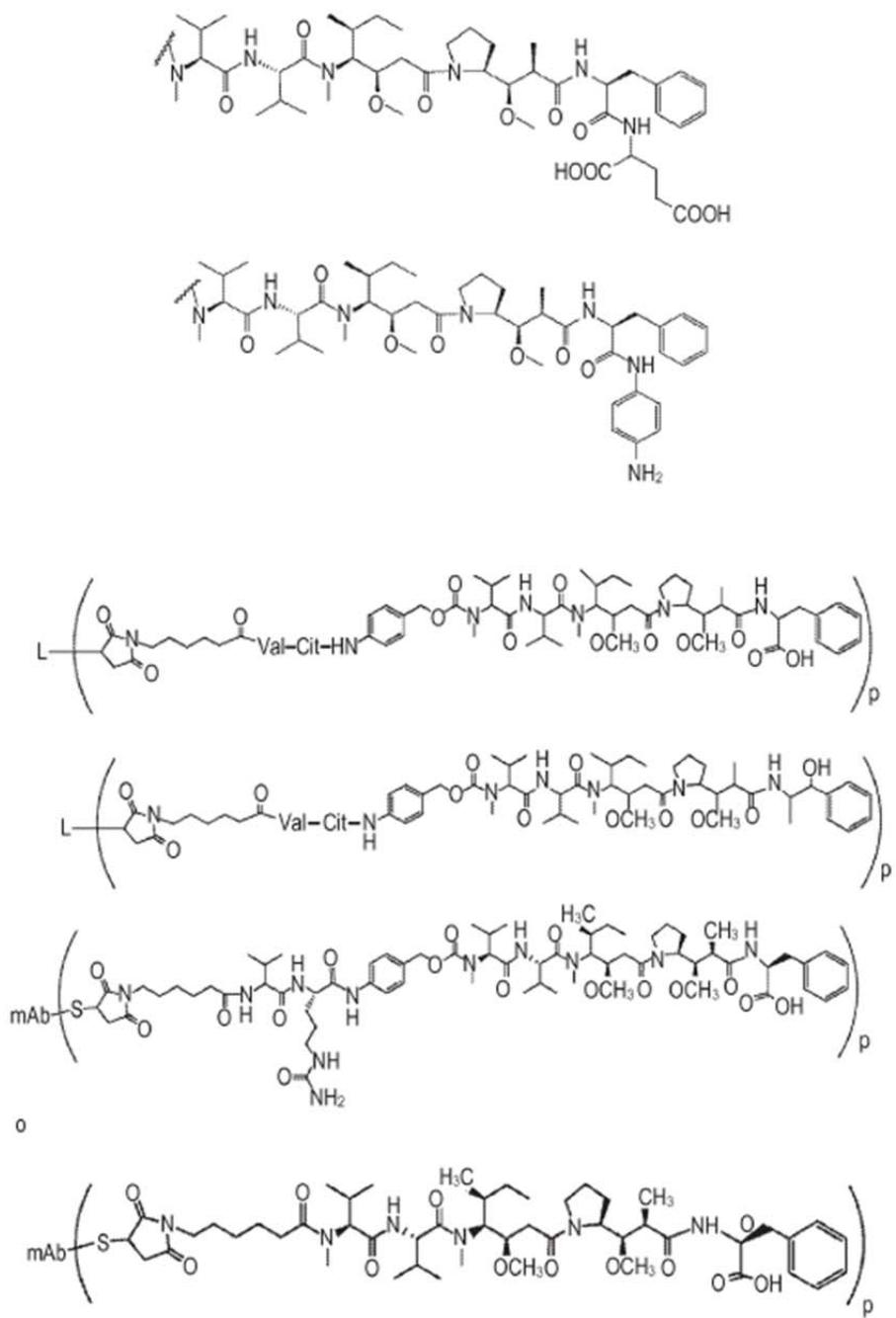
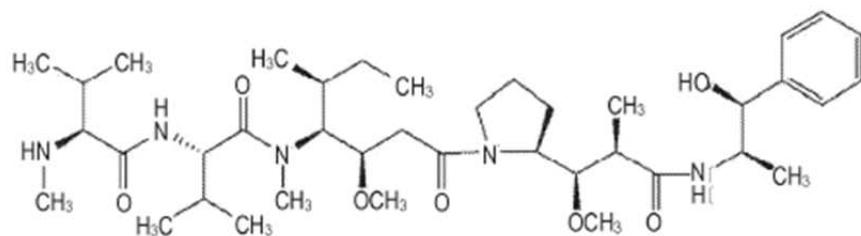
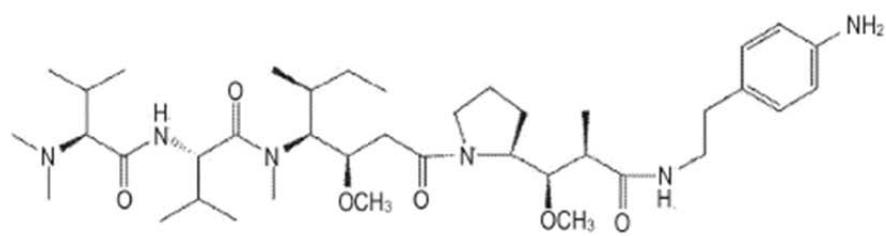
FIGURA 11B

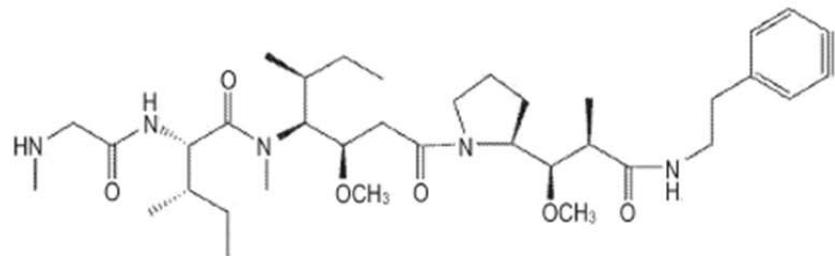
FIGURA 11C



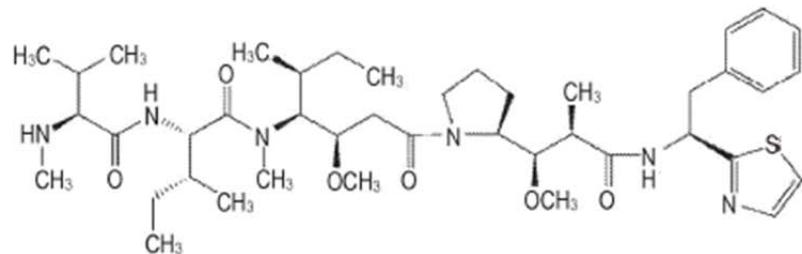
(XI)



(XII)



(XIII)



(XIV)

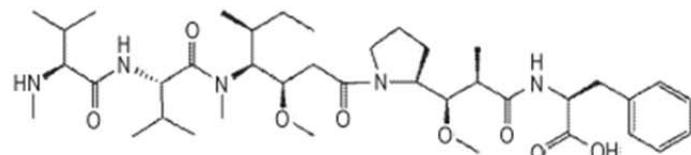
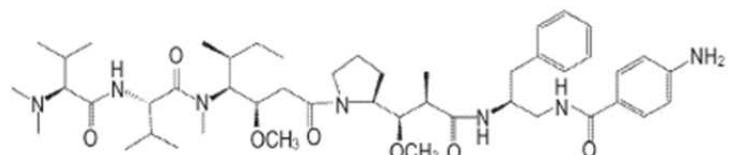
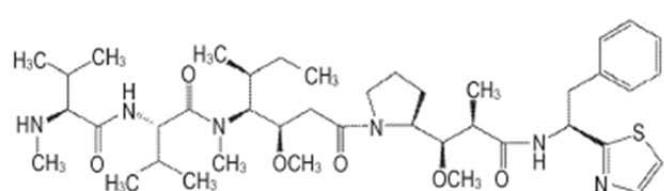
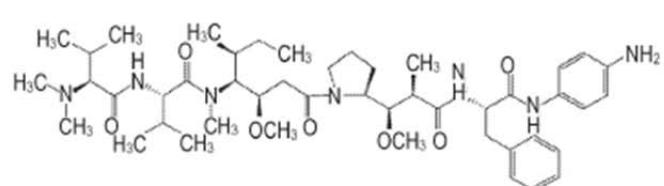
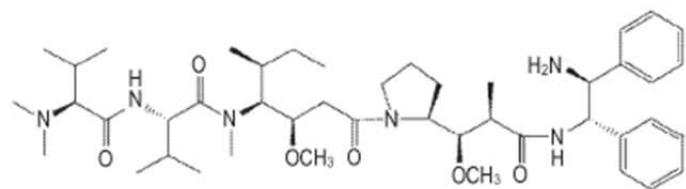
FIGURA 11D

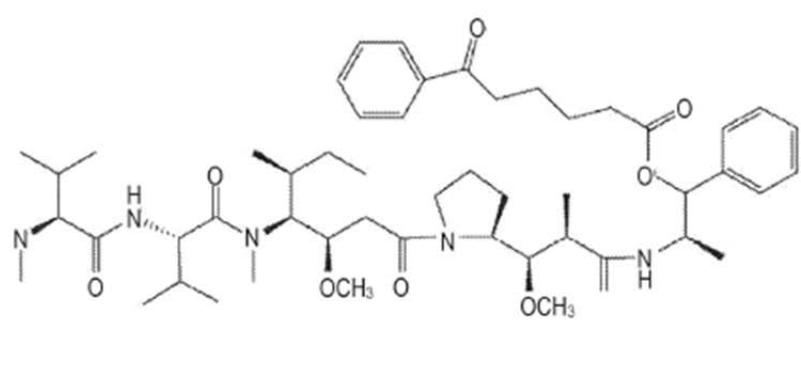
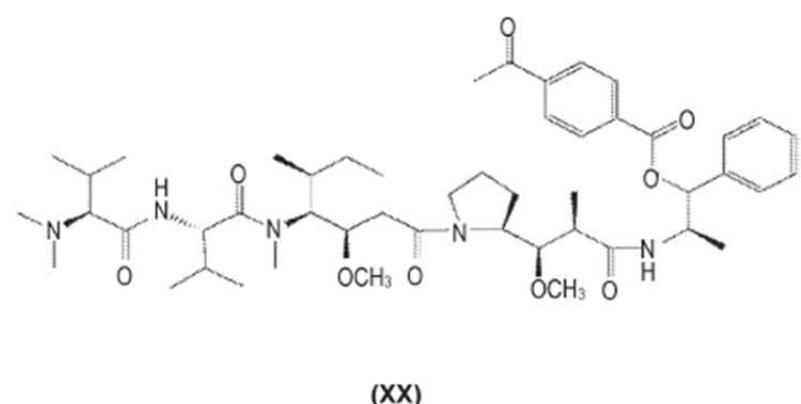
FIGURA 11E

FIGURA 12

BM2		BM1		TSF19		TSF79	
E	76	N	120	G	91	K	121
H	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
M	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	M	110	E	239
L	112	V	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
T	114	Q	236	Q	115	C	275
Q	115	T	237	T	148	K	276
T	116	E	239	V	192	F	284
V	117	W	241	R	194	V	288
C	119	Q	272	R	195	K	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	P	291
T	191	C	275	A	199	E	292
V	192	K	276	H	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	P	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
E	198	T	297	K	234		
A	199	S	298				
Q	231						
E	233						
K	234						

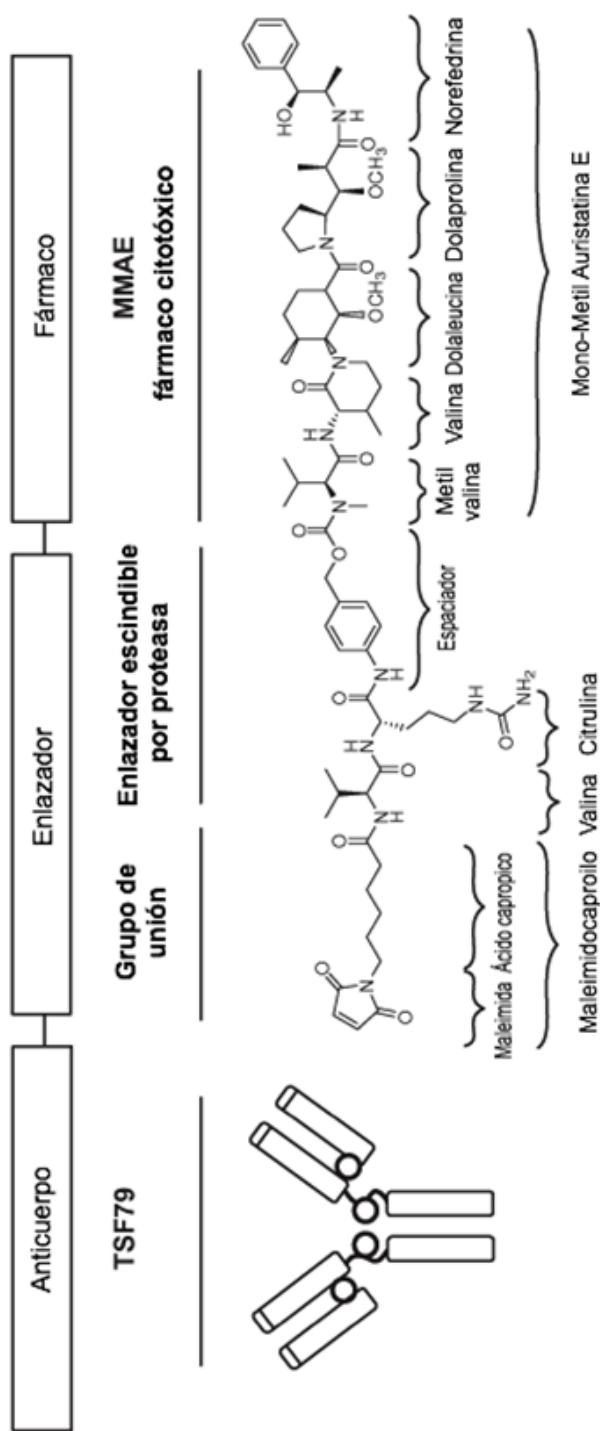
FIGURA 13

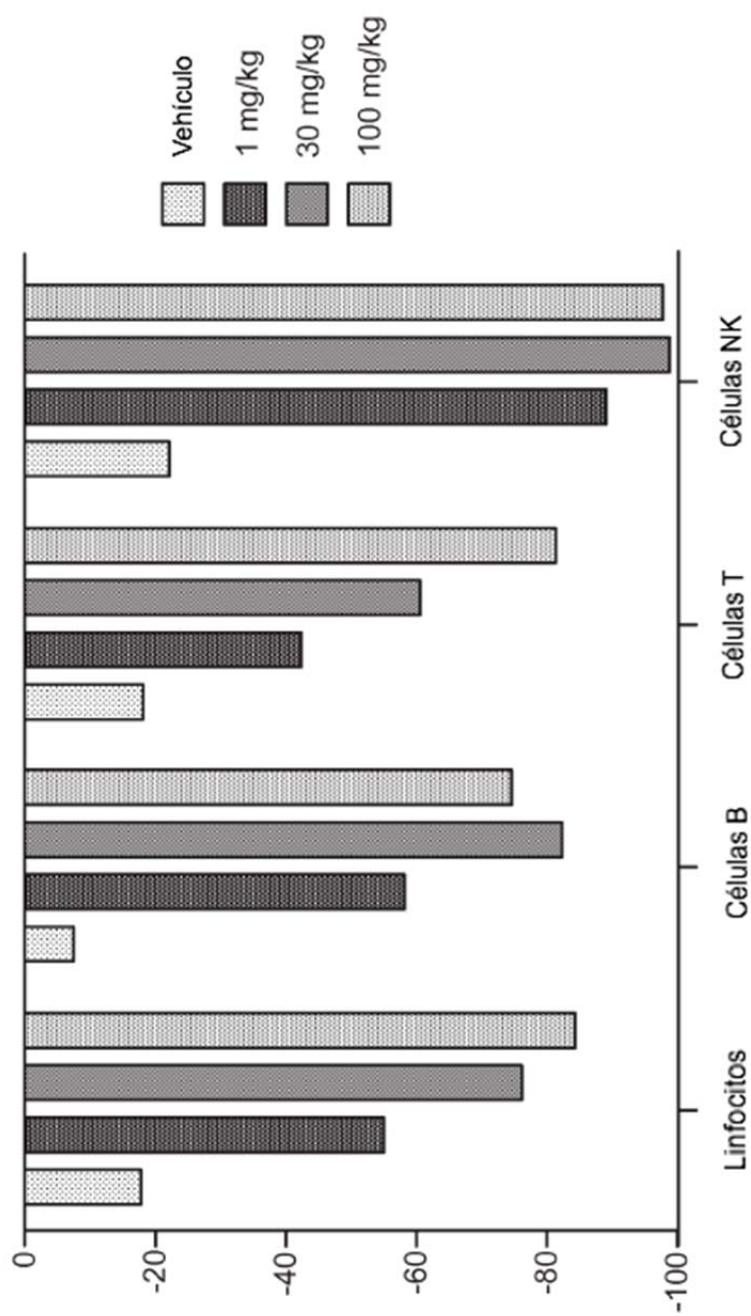
FIGURA 14

FIGURA 15